

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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

2013 年 4 月

森 英詞

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

提出先 大阪大学大学院情報科学研究科

提出年月 2013 年 4 月

森 英詞

学位取得に関わる発表論文

学術雑誌

[1] Eiji Mori, Chikara Furusawa, Shuichi Kajihata, Tomokazu Shirai, Hiroshi Shimizu, “Evaluating ^{13}C enrichment data of free amino acids for precise metabolic flux analysis”, *Biotechnology Journal*, 6, 1377 – 1387 (2011) (博士論文第 2 章)

国際会議

[1] Eiji Mori, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu, “Metabolic flux analysis on ^{13}C labeling pattern of intracellular amino acids in *Escherichia coli*”, Asian Congress on Biotechnology, Poster number B1303, Shanghai, China, May 11-15, 2011 (博士論文第 2 章)

[2] Eiji Mori, Shuichi Kajihata, Yuki usui, Takashi Hirasawa, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu, “Analysis of metabolic shift in *pgi* expression-controlled *Escherichia coli* using labeling information of intermediate metabolites”, Foundations of Systems Biology in Engineering, Poster number 28, Tsuruoka, Japan, Oct 21-25, 2012 (博士論文第 3 章)

国内会議

[1] 森 英詞, 古澤 力, 清水 浩, “遊離アミノ酸の ^{13}C 濃縮度に基づく大腸菌フラックス解析”, 日本農芸化学会, 京都, 3 月 25 – 28, 2011

[2] 森 英詞, 古澤 力, 梶畠 秀一, 白井 智量, 清水 浩, “遊離アミノ酸データに基づくフラックス解析に向けた ^{13}C 濃縮度ダイナミクスの解析”, 日本生物工学会, 東京, 9 月 26 – 28, 2011

[3] 長廻 達也, 森 英詞, 梶畠 秀一, 古澤 力, 清水 浩, “中間代謝産物の ^{13}C 濃縮度時系列データに基づく動的代謝解析法の開発”, 日本生物工学会, 東京, 9 月 26 – 28, 2011

内容梗概

人は古くから微生物を用いて有用な物質を生産してきた。近年においては、様々な生命現象が解明され、微生物の代謝を改変する技術の進歩により、生命現象を利用した物作りが可能となった。例えば、遺伝子組換え大腸菌により、ガソリンとエネルギー密度が近いバイオブタノールの生産に成功している。このような技術はオイルリファイナリーからバイオリファイナリーへの転換に貢献し、将来的には再生可能でカーボン・ニュートラルな物作りへと繋がると考える。しかし、多くの場合、新規化合物の合成に成功しても、その生産収率は低い場合が多い。そのために、細胞がどのような代謝状態にあり、どのように代謝を改変したら効率的に目的物質を生産できるようになるのかを議論するのは重要なことである。

代謝フラックス解析は基質がどの代謝経路を通過して目的物質となったのかを定量的に解析することができる。例えば、どれだけの基質が目的物質、または副産物となったのかを知ることができるため、物質生産菌の代謝状態を把握するための指標として用いることができる。代謝フラックス解析で広く用いられる手法に、 ^{13}C 標識された基質を用いて微生物を培養し、その代謝産物の標識情報から代謝フラックスを推定する手法が存在する。その標識情報源の代謝産物として、タンパク質由来アミノ酸、遊離アミノ酸、中間代謝産物が使用される。これらは順番に蓄積量が少なくなり、 ^{13}C 標識された基質によるこれらの標識時間が短くなる特徴を持つ。蓄積量が多く、標識情報の測定が容易であるタンパク質由来アミノ酸の標識情報を利用した代謝フラックス解析が従来法として確立されている。しかし、一般に代謝フラックス解析では、標識開始からサンプリングまでの代謝状態が一定であるという制約を課しているため、タンパク質由来アミノ酸を用いる場合には比較的長時間にわたって代謝状態を一定にする必要がある。このため、タンパク質由来アミノ酸の標識情報を利用する手法は、代謝状態を一定に保つことのできる連続培養や回分培養などに制限されてきた。一方、遊離アミノ酸や中間代謝産物は蓄積量が相対的に小さいためにその標識時間は短い。この標識時間の短さは、必要とされる培養時間の短縮、物質生産の現場で好まれる流加培養への代謝フラックス解析の適用へと繋がる可能性を持つ。そこで本研究では、遊離アミノ酸と中間代謝産物の標識情報を用いた代謝フラックス解析法を構築し、その適用範囲を明らかにすることを目的とした。

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

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の可能性について議論した。

目次

1章 緒論.....	1
1-1 物質生産と代謝解析.....	1
1-2 代謝フラックス解析.....	3
1-3 発酵過程の代謝フラックス解析における課題.....	5
1-4 本論文の目的と構成.....	9
2章 遊離アミノ酸の ¹³ C 標識時間の解析.....	11
2-1 緒言.....	11
2-2 実験材料と実験方法.....	13
2-2-1 使用菌株.....	13
2-2-2 使用培地.....	13
2-2-3 培養操作.....	13
2-2-3-1 前培養.....	13
2-2-3-2 連続培養実験.....	13
2-2-3-3 ¹³ C 標識実験.....	14
2-2-4 サンプルリングとサンプル前処理.....	15
2-2-4-1 菌体、菌体培地、培養液上清.....	15
2-2-4-2 タンパク質由来アミノ酸.....	15
2-2-4-3 遊離アミノ酸.....	15
2-2-5 各種成分の測定.....	16
2-2-5-1 菌体濃度.....	16
2-2-5-2 グルコース濃度.....	16
2-2-5-3 有機酸濃度.....	16
2-2-5-4 エタノール濃度.....	16
2-2-5-5 酸素比消費速度.....	17
2-2-5-6 乾燥菌体重量.....	17
2-2-6 GC-MS によるアミノ酸分析.....	18
2-2-6-1 サンプル誘導体化.....	18
2-2-6-2 分析条件と測定.....	18
2-2-7 代謝フラックス解析.....	20
2-2-7-1 ¹³ C 濃縮度の算出.....	20
2-2-7-2 ¹³ C 濃縮度の天然同位体含量の補正.....	21
2-2-7-3 代謝反応モデル.....	24
2-2-7-4 代謝フラックス解析のアルゴリズム.....	26

2-3 結果と考察.....	29
2-3-1 大腸菌の連続培養実験.....	29
2-3-2 タンパク質由来アミノ酸と遊離アミノ酸の ¹³ C 濃縮度経時変化.....	32
2-3-3 異なる酸素供給量条件における大腸菌の代謝フラックス分布.....	42
2-4 結言.....	46
3章 遺伝子発現量の変化に伴う代謝状態の解析.....	48
3-1 緒言.....	48
3-2 実験材料と実験方法.....	51
3-2-1 使用菌株.....	51
3-2-2 使用培地.....	52
3-2-3 培養操作.....	53
3-2-3-1 前培養.....	53
3-2-3-2 連続培養実験.....	53
3-2-3-3 ¹³ C 標識実験.....	53
3-2-4 サンプルリングとサンプル前処理.....	53
3-2-4-1 中間代謝産物.....	54
3-2-4-2 RNA 抽出用の菌体.....	54
3-2-5 各種成分の測定.....	54
3-2-6 CE-MS による中間代謝産物分析.....	55
3-2-6-1 分析条件と測定.....	55
3-2-6-2 ¹³ C 濃縮度の定量.....	55
3-2-6-3 中間代謝産物量の定量.....	55
3-2-7 <i>pgi</i> 遺伝子発現量解析.....	56
3-2-7-1 Total RNA の抽出.....	56
3-2-7-2 逆転写反応.....	56
3-2-7-3 Linear plasmid の作成.....	56
3-2-7-4 リアルタイム RT-PCR.....	56
3-2-8 代謝フラックス解析.....	57
3-3 結果と考察.....	59
3-3-1 グルコース比消費速度と有機酸比生産速度の経時変化.....	59
3-3-2 <i>pgi</i> 発現量の経時変化.....	61
3-3-3 代謝フラックス解析.....	63
3-3-4 代謝フラックス分布.....	70
3-3-5 Glucose-6-phosphate に関わる代謝フラックスの変化.....	73
3-4 結言.....	75

4章 結論.....	77
4-1 結果のまとめ.....	77
4-2 得られた知見の寄与するところ.....	78
4-3 展望.....	81
参考文献.....	83
Appendix.....	90
本論文で用いた略語.....	90
代謝フラックス分布.....	92
実測 ^{13}C 濃縮度と推定 ^{13}C 濃縮度 (3章 培養 60 時間後サンプル).....	94
謝辞.....	95

1 章 緒論

1-1 物質生産と代謝解析

人は古くから微生物を用いて発酵食品を生産しており、ワイン、ビール、チーズ、日本酒などが有史以前より、世界各国において生産されてきた。発酵によって特定の菌がその環境における優先種となり、結果的に食品を低 pH といった一定の環境状態に留める。これは食中毒などの原因菌の増殖を防ぐことに繋がり、保存方法の乏しかった時代においては重宝した加工法として利用されてきた。現在では一般的な事実として、発酵は微生物である酵母や麹菌によって、食中毒は病原性大腸菌などによって引き起こされることが知られている。しかし、当時は発酵を引き起こす一連の過程は知られていても、その原因が何であるのかは不明とされてきた。このように人は原因を理解していた訳ではないが古くから微生物を利用して発酵食品という有用物質の生産を行なってきた。

1950 年以降から 1960 年代にかけては、DNA の二重らせん構造の解明といった生命現象の理解に関わる重要な発見が相次いだが、遺伝子組換え技術や DNA 配列決定法などの技術の確立には至っていなかった。そのため、この頃は培養条件を工夫することにより、アミノ酸などの生産性向上が行われていた（例えば Shiio *et al.*, 1962）。その後、1970 年代から 1980 年代にかけて、先に述べた微生物の改変技術が確立された。そして、さらなる技術革新により、現在では細胞は、核酸、糖、有機酸、アミノ酸、脂質など多くの低分子と DNA、RNA、多糖、タンパク質などの高分子を含むことが明らかとなっている。これらの複雑な相互作用の結果として、細胞は生命活動を維持し、増殖することが判明している。従って、人は過去において生命活動の一部を利用、向上するにすぎなかったが、現在では生命活動を理解し、それを任意に改変する技術を手に入れたといえる。

生命情報に関わる知見が少なかった頃には、物質生産株の獲得手段としてスクリーニングが行われていた。広く用いられている手法として、ランダムスクリーニングがある。この方法では、無作為にゲノム DNA に変異を導入することで、その結果として生産性の向上した菌株を選抜し取得する。例えば、アナログ物質を用いたスクリーニングがある。目的物質のフィードバック阻害を担う機構が変化したアナログ耐性株を取得する手法で、例えばリジン生産菌の獲得に利用されてきた (Komatsubara *et al.*, 1979, Hirao *et al.*, 1989)。これらのスクリーニングによる物質生産株の育種は、代謝経路情報などが乏しい場合において有用ではあるが、偶発的な現象に依存している点で効率的でなく、特定した反応に関する改変とも言えない。一方、遺伝子組換え技術は、目的物質あるいは副産物の合成に関わる一連の遺伝子が明確であれば、それら遺伝子を特異的に改変し、細胞の本来もっている機能を改変することができる。それが主要な副産物として生産さ

れる有機酸などの遺伝子であれば、目的物質の収率の向上に繋がる可能性がある。また、他生物から遺伝子を宿主生物へと導入することにより、本来宿主が持たない性質を付与することもできる。このような遺伝子組換え技術の発展は、細胞内の代謝反応系の解析と相まって代謝工学の概念の誕生に繋がった。代謝工学とは「組換え DNA 技術を用いた細胞内の特定の反応の改変や新しい反応の導入により、指定された目的物質生産や菌体の特性の改変を目指すこと」と定義される (Stephanopoulos *et al.*, 1998)。そして、代謝工学的に改変された生物によって、食品添加物、化学物質、燃料などが合成されている (Okamoto *et al.*, 1997、Atsumi *et al.*, 2008、Jojima *et al.*, 2010)。

代謝工学の立場から物質生産株の育種を考えると、改変後の細胞がどのような状態に置かれており、次にどの代謝経路を改変すればより生産性が向上するのかという問題に直面する。そのため、物質生産株の生産性を評価できる何らかの指標が必要とされる。微生物を利用した物づくりとは、物質生産株が代謝反応によって基質を目的物質に変換することに対応する。定量的に表すと、単位時間、菌体あたりの各物質間の代謝反応量となり、この代謝反応量を代謝フラックスと呼ぶ。目的物質の生産速度は、それを生成する代謝フラックスに対応するために、物質生産菌の評価の指標として代謝フラックスが重要となる (Follstad *et al.*, 1999、Roscher *et al.*, 2000、Zamboni *et al.*, 2005、Antoniewicz *et al.*, 2007)。

1-2 代謝フラックス解析

代謝フラックスを定量する解析手法として代謝フラックス解析がある。対象とする全代謝経路の代謝フラックス、つまり代謝フラックス分布は、代謝量論式と菌体や有機酸などの測定できる比生産速度から物質収支を考慮して推定される。しかしながら、中央代謝経路にいくつか含まれる可逆反応、TCA サイクルのような閉じた回路、ペントースリン酸経路のように分岐して合流する代謝経路の代謝フラックスを求めることは難しい。これらを求めるためには通過した代謝経路に依存した代謝産物の標識情報を必要とする。そこで、細胞に ^{13}C グルコースのような標識された基質を細胞に取り込ませ、そのときの代謝状態に依存した標識情報を持つ ^{13}C 代謝産物質量を生産させる。そして、質量分析器や核磁気共鳴 (NMR; nuclear magnetic resonance) を用いて、それら分析することで、標識情報を後述する ^{13}C 濃縮度に変換できる。そして、その値に基づいて中央代謝経路の代謝フラックス分布を定量的に求めることができる (Szyperski, 1995, Dauner and Sauer, 2000)。

物質生産株の育種の指標として代謝フラックス解析を適用することで、遺伝子組換えの前後において、基質から目的物質への代謝フラックスがどのように変化したのかを定量的に把握できる。従って、行われた遺伝子組換え、あるいは培養条件の変更が効果的なものであったのか、そうではなかったのか、次にどこの代謝経路を改変するのが物質生産に有効であるのか、といった方針を得ることができる。例えば、基質に含まれる炭素は、アルコール、有機酸といった目的物質以外の副生産物に変換される場合がある。代謝フラックス解析では、複数の代謝経路の代謝フラックスを同時に求めることができるため、どの経路が最も主要な副生産物経路であるかを特定できる。また、二酸化炭素のように同一物質でありながら、ペントースリン酸経路、補充経路、TCA サイクルといった複数の代謝経路から生産される物質に関しても、どの経路が主要な生産経路となっているかを特定できる。実際に代謝フラックスを用いて物質生産における重要な代謝経路の特定はこれまでにに行われており、Shirai らは Tween40 という脂肪酸エステル添加によるコリネ型細菌のグルタミン生産誘導には、補充経路であるピルビン酸カルボキシラーゼ (Pc) が触媒する代謝フラックスの増加が重要であることを報告している (Shirai *et al.*, 2007)。グルタミン酸は二オキソグルタル酸 (αKG) を前駆体としており、その生産に対して正に働く代謝経路の酵素として Pc とホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸リアーゼがあり、負に働くのはホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ、リンゴ酸酵素がある。Shirai らは結果に基づいた育種までは行っていないものの、以上の複数の代謝経路の中から物質生産に有効な代謝経路を特定しており、物質生産菌の効率的な育種に対する代謝フラックス解析の有効性を示唆している。

中央代謝経路のような分岐と合流などを含む代謝経路の代謝フラックス分布を求めるには、先に述べたように代謝産物の ^{13}C 標識情報を必要とする。従来法として、細胞内に大量に含まれるタンパク質由来アミノ酸の標識情報を利用する手法が一般的とされてきた (Sauer *et al.*, 1997, Christensen and Nielsen, 1999, McKinlay *et al.*, 2007)。タンパク質は加水分解されることによって、物理化学的に安定した多量のタンパク質由来アミノ酸となる。そのため、その標識情報は質量分析器などによって容易、かつ安定に計測される。一方、 ^{13}C グルコースなどによって標識される ^{13}C 代謝産物はタンパク質だけでなく、前駆体である遊離アミノ酸や中間代謝産物も含まれる。これらの物質の菌体当たりの蓄積量はタンパク質由来アミノ酸量よりも桁違いに少ない (Table 1-1) (Nöh *et al.*, 2007, Taymaz-Nikerel *et al.*, 2009)。従って、この測定の容易さ、物理化学的な安定性の高さがタンパク質由来アミノ酸の標識情報を代謝フラックス解析に利用する際の利点となる。しかし、容易に測定できる蓄積量の多さは逆に欠点ともなり、標識開始から十分な標識割合を得るまでの時間は一般に長い。実験手法において後述するが、代謝フラックス解析は、代謝産物の合成と消費がバランスし、標識情報に変化のない、定常状態にあることを前提としている。そのため、標識開始から十分な標識割合を得るまでの間、代謝状態を一定に保つ必要がある。この間に代謝が変化すると標識割合に複数の代謝情報が混在することになり、代謝フラックス分布の推定を適切にできない。このような特性をもつため、代謝フラックス解析の標識情報としてタンパク質由来アミノ酸を用いる場合、連続培養の定常状態 (Nissen *et al.*, 1997, Granström *et al.*, 2002) や回分培養の対数増殖期 (Shirai *et al.*, 2005) といった菌体の代謝状態が変化しない環境が適用範囲となる。

Table 1-1 細胞内物質の蓄積量

^{13}C 標識される物質	細胞内蓄積量 [$\mu\text{mol/gDW}$]
タンパク質由来アミノ酸 (PAA)	200 - 600
遊離アミノ酸 (FAA)	0.022 - 75
中間代謝産物 (IM)	0.13 - 2.65

中間代謝産物の細胞内蓄積量は中央代謝経路を構成する物質に限定している。最小蓄積量は遊離アミノ酸よりは多いものの、各中間代謝産物の蓄積量は相対的に少ない。

1-3 発酵過程の代謝フラックス解析における課題

工業的な物質生産プロセスに利用されるファーメンターの大きさは、アミノ酸では数十万リットルに及ぶ (Madigan *et al.*, 2003)。このため、コンタミネーションが問題とされる。連続培養では、雑菌に汚染されるとその影響が長時間に及ぶ欠点がある。このような汚染の影響を小さくするため、一般に流加培養や回分培養が利用される。また、流加培養では、菌体増殖期と物質生産期を分けた2段階培養が行われることがあり、2段階目の高菌体濃度で目的物質を短時間で得る工夫がなされている (Fig. 1-1)。このような例として、大腸菌を利用したグルカゴン様タンパク質やフェニルアラニンの生産などがある (Gerigk *et al.*, 2002, Zhou *et al.*, 2012)。代謝状態の移行は、遺伝子発現を誘導する薬剤の添加などにより行われるが、添加するタイミング、添加量は代謝変化に影響を及ぼす。そのため、所作の時間内に物質生産性を最大にするためには、代謝が変化している際の解析が重要となる。上述した従来のタンパク質由来アミノ酸ではその標識時間は数十時間である一方、薬剤などによる代謝状態の移行は3、4時間で起きる。また、移行が完了した後の物質生産期もその標識時間を待たずに終了してしまう。従って、従来法では、細胞増殖期と物質生産期の代謝フラックス分布の違い、代謝状態が移行している間の代謝フラックス分布を解析することが難しいとされてきた。

近年、このような標識時間の問題を克服するために、遊離アミノ酸や中間代謝産物の標識割合を代謝フラックス解析に適用する試みが行われている。以下に、連続培養における代謝産物の物質収支の模式図を用いて、各 ^{13}C 代謝産物の標識時間について説明する (Fig. 1-2)。増殖期において、菌体構成成分以外への代謝経路はなく、分解の影響もないことを仮定している。そして、連続培養における中間代謝産物の物質収支式に標識情報を加えたものが、式 1-1 である。

$$\frac{d(C_{\text{IM}}I_{\text{IM}}VX)}{dt} = rVXI_{\text{Glc}} - rVXI_{\text{IM}} - FXC_{\text{IM}}I_{\text{IM}}$$

(式 1-1)

ここで、 r [mmol/gDW/h] は、単位時間、菌体あたりの物質質量である代謝フラックスを表す。また、 I_x [無単位] は、細胞内物質 x の ^{13}C 濃縮度を意味しており、 x には Glc、IM、FAA、PAA のいずれかが入り、それぞれグルコース、中間代謝産物、遊離アミノ酸、タンパク質由来アミノ酸の ^{13}C 濃縮度を表している。 C_y [mmol/gDW] は、細胞内物質 y の乾燥菌体重量あたりの蓄積量を意味しており、 y には IM、FAA、PAA のいずれかが入る。 F [L/h] は、培地の単位時間あたりの流入量、あるいは流出量を表す。 V [L] は培養槽の体積、 X [g/L] は菌体濃度を表す。この式において物質収支に着目した場合、中間代謝産物は、グルコースからの合成 [mol/h]、遊離アミノ酸への消費 [mol/h]、連続培養による流出 [mol/h] によってバランスしている。連続培養において、菌体当たり

の代謝産物の蓄積量 C_v 、培養体積 V 、菌体濃度 X は一定として扱えるため、式 1-1 は標識割合の変化を示す式 1-2 へ変換できる。さらに、 $F [L/h] / V [L]$ は希釈率 $D [h]$ 、つまり、比増殖速度 $\mu [h]$ となる (式 1-3)。遊離アミノ酸、タンパク質由来アミノ酸についても同様の式を構築すると式 1-4、式 1-5 となる。式 1-4 の遊離アミノ酸の標識割合の変化は、合成、消費、菌体の希釈による消費でバランスしており、中間代謝産物と同様である。しかし、タンパク質の物質収支は前駆体からの合成と菌体希釈による消費だけでバランスしており、先の代謝産物へ向かう消費がない。そのため、標識割合の変化は式 1-5 のように表される。一方、中間代謝産物や遊離アミノ酸では、取り込んだ物質のほとんどは次の代謝産物へと流されるため、菌体希釈の影響はかなり小さいと考えられる。このとき、式 1-3、1-4 から菌体希釈の項を無視できる程度とすると、式 1-5 と類似の式となる。そして、代謝産物間に分岐経路がないという仮定から、 r は共通の定数となる。従って、各 ^{13}C 代謝産物のある時点における ^{13}C 濃縮度の変化は、菌体に占めるそれらの蓄積量の逆数と ^{13}C 濃縮度の差の積によって求められることになる。そして、Table 1-1 に示した通り、細胞内のタンパク質由来アミノ酸は遊離アミノ酸などに対して桁違いに多い。従って、これらの式は、最も蓄積量の多いタンパク質由来アミノ酸の標識が完了するまでの時間が他の 2 つよりも長いことを示している。そして、式 1-5 が示すように希釈率により、その時間は制御される。例えば増殖速度が $0.2 [h]$ のときに、タンパク質由来アミノ酸の 99 % が標識されるためには、およそ数十時間を要する。中間代謝物質や遊離のアミノ酸は、その蓄積量に対して生成/消費フラックスは大きく、標識時間は短くなる。これらの標識時間の短さは、流加培養のように代謝が変化したとしても、ある瞬間においては定常状態を仮定できる可能性を持つため、代謝フラックス解析への適用が期待されている。タンパク質由来アミノ酸では、標識時間が長く、標識情報に複数の代謝状態が混在してしまう。

$$\frac{d(I_{IM})}{dt} = \frac{r}{C_{IM}} (I_{Glc} - I_{IM}) - \frac{F}{V} I_{IM} \quad (式 1-2)$$

$$\frac{d(I_{IM})}{dt} = \frac{r}{C_{IM}} (I_{Glc} - I_{IM}) - \mu I_{IM} \quad (式 1-3)$$

$$\frac{d(I_{FAA})}{dt} = \frac{r}{C_{FAA}} (I_{IM} - I_{FAA}) - \mu I_{FAA} \quad (式 1-4)$$

$$\frac{d(I_{PAA})}{dt} = \frac{r}{C_{PAA}} I_{FAA} - \mu I_{PAA} \quad (式 1-5)$$

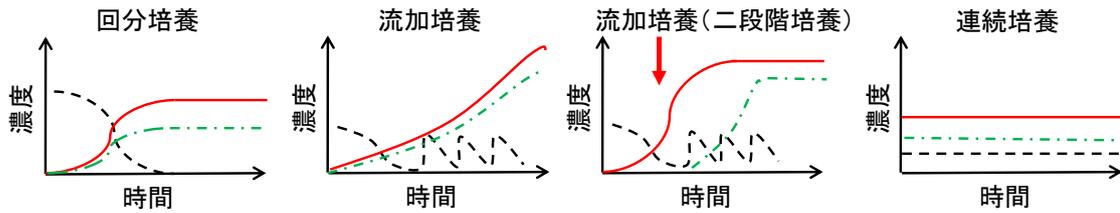


Fig. 1-1 培養様式による代謝状態の模式図

回分培養は初期の基質のみで培養を行う。流加培養では基質を追加する。二段階培養では、赤色矢印の部分で薬剤を添加し、菌体を物質生産期に誘導してから、短時間で反応を行う。連続培養では、同量の培地を流入、流出させ、代謝状態を一定に保つ。黒破線は基質濃度、緑破線は目的物質濃度、赤実線は菌体濃度を表す。

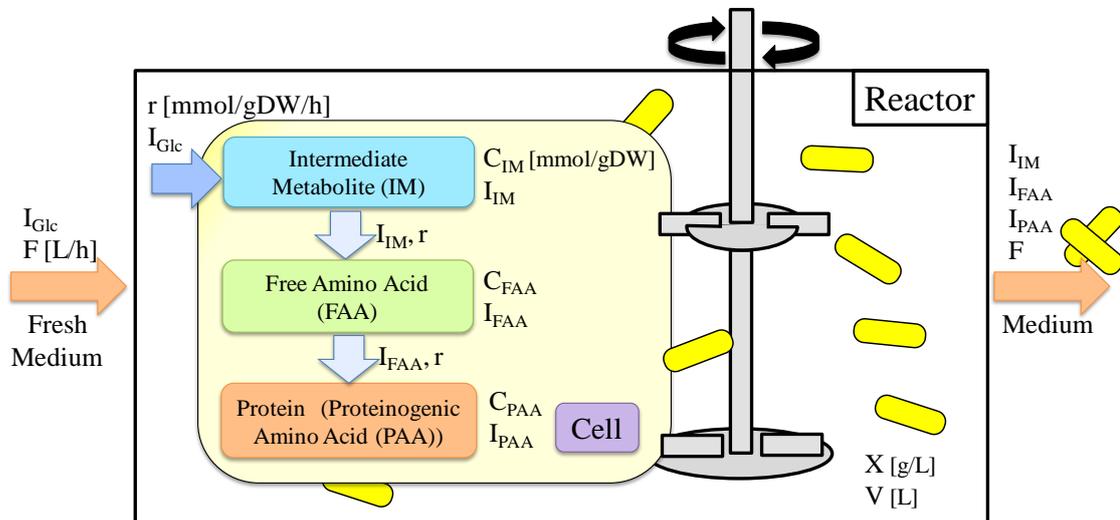


Fig. 1-2 連続培養における細胞内代謝産物の物質収支モデル

このモデルでは細胞内物質の合成と消費、そして、培地の流出による希釈がバランスしており、代謝的に定常状態にある。 r [mmol/gDW/h] は、単位時間、菌体あたりの物質量である代謝フラックスを表している。増殖期における菌体構成成分以外への代謝経路はなく、分解の影響もないことを仮定している。そのため、中間代謝産物への代謝フラックスが決定されると、連続する遊離アミノ酸、タンパク質への代謝フラックスも同一となる。また、 I [無単位] は、細胞内物質の ^{13}C 濃縮度を意味しており、 I_{Glc} 、 I_{IM} 、 I_{FAA} 、 I_{PAA} はそれぞれグルコース、中間代謝産物、遊離アミノ酸、タンパク質由来アミノ酸の ^{13}C 濃縮度を表している。 C [mmol/gDW] は、乾燥菌体重量あたりの物質量を意味しており、 C_{IM} 、 C_{FAA} 、 C_{PAA} はそれぞれグルコース、中間代謝産物、遊離アミノ酸、タンパク質由来アミノ酸の乾燥菌体あたりの物質量を意味している。 F [L/h] は培地の流入、あるいは流出速度、 X [g/L] は菌体濃度、 V [L] は培養槽の体積を表している。

遊離アミノ酸の代謝フラックス解析への適用例として、2004年に Wahl らの大腸菌のフェニルアラニン生産、Krömer らのコリネ菌のリジン生産の解析がある。前者はNMR、後者はガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS; Gas chromatograph-mass spectrometry) を利用して遊離アミノ酸の標識情報を測定している (Wahl *et al.*, 2004, Krömer *et al.*, 2004)。物質生産菌は、取り込んだ基質の多くを主要な菌体構成成分であるタンパク質ではなく、目的物質へと変換するため、比増殖速度が小さくなる。従って、タンパク質由来アミノ酸には、グルコースから取り込まれた ^{13}C 標識はほとんど取り込まれない。そのため、相対的に蓄積量の少なく、 ^{13}C 標識割合が定常に達する時間 (標識時間) が短い遊離アミノ酸を利用する方法が試められている。また、従来利用されてきたタンパク質由来アミノ酸を扱う実験手技、分析装置は共通である場合が多く、技術的に移行が容易であるという点も本手法の利点として挙げられる。Iwatani らは、この遊離アミノ酸を利用した解析法を流加培養に適用している (Iwatani *et al.*, 2007)。そして、その標識時間は、どのようなタイムスケールで変化する培養系に適用できるかを示す指標となるが、十分に議論されていない。従って、遊離アミノ酸の標識時間を定量することは、その手法を適用できる範囲を明らかにすることに繋がると考えられる。

中間代謝産物の代謝フラックス解析への適用例として、van Winden らによる酵母の連続培養の代謝解析がある (van Winden *et al.*, 2005)。また、Costenoble らは、酵母の流加培養に中間代謝産物を利用した代謝フラックス解析を適用している (Costenoble *et al.*, 2007)。そして、中間代謝産物の標識時間は、Nöh らによって数分程度と報告され、先の遊離アミノ酸やタンパク質由来アミノ酸よりも短いとされている (Nöh *et al.*, 2007)。このような中間代謝産物を利用した代謝フラックス解析の発展には、分析機器の進歩が関わっており、上述の例では液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS; Liquid chromatograph-mass spectrometry) による測定系の確立が貢献している。さらに、近年ではキャピラリー電気泳動質量分析 (CE-MS; Capillary electrophoresis-mass spectrometry) による新しい中間代謝産物の測定手段が Soga らによって確立され、LC-MS と同様に中間代謝産物を利用した代謝フラックス解析に貢献している (Soga *et al.*, 2002, Toya *et al.*, 2010)。以上のように、中間代謝産物は有益な特徴を持つが、変化する代謝状態を追従できるのか、まだ十分に議論がなされていない。

1-4 本論文の目的と構成

これまでに確立された ^{13}C 代謝フラックス解析は、代謝産物の ^{13}C 標識情報を得る対象としてタンパク質由来アミノ酸を選択してきた。しかしながら、タンパク質の標識情報が定常に達するまでの時間は長いため、その間に代謝状態が様々に変化すると、その標識情報は一つの代謝状態のみを反映したものではなくなる。そのため、この手法の適用範囲は、代謝を定常状態に維持できる培養系に限定されてきた。このような欠点を克服する手段として、標識情報が短時間で定常に達する中間代謝産物、遊離アミノ酸の標識情報に基づく代謝フラックス解析が研究されている。代謝フラックス解析では、菌体の代謝状態は定常状態と仮定され、物質の合成と消費はバランスしており、細胞内代謝産物の量、標識情報に変化はないとされる。1-3 節で触れた通り、このような状況では、代謝産物の標識時間は、その物質の蓄積量に依存して変化する。このため、タンパク質由来アミノ酸よりも蓄積量の少ない遊離アミノ酸、中間代謝産物はタンパク質よりも標識時間が短くなる。従って、遊離アミノ酸や中間代謝産物の細胞内蓄積量の変化がなく、代謝状態が短い時間スケールで標識情報に反映され、定常に達するのであれば、一般的に物質生産で好まれる代謝が変化する流加培養であっても代謝フラックス解析を適用できると期待できる。

遊離アミノ酸は物理化学的に安定であり、中間代謝産物よりも測定が容易である利点を持つ。しかし、その標識時間はどの程度短いということは定量されたことがなく、タンパク質由来アミノ酸とどれほど差があるのか厳密なデータはない。従って、この標識時間を明らかにすることにより、将来的に遊離アミノ酸の標識情報を用いた代謝フラックス解析が流加培養に適用できる可能性を検討する。一方、中間代謝産物の標識時間は分単位とされ、遊離アミノ酸やタンパク質由来アミノ酸よりも短いと知られる。この標識時間の短さから流加培養であっても定常状態に基づいた代謝フラックス解析が可能と考えられ、議論がなされている。しかし、その適用範囲として、代謝状態の変化を追従できるかについては曖昧とされている。本学位論文では、これら遊離アミノ酸と中間代謝産物の標識情報を用いた代謝フラックス解析について、その実験系の構築と適用範囲の評価を行うことを目的にする。

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、物質生産と代謝解析、代謝フラックス解析、発酵過程の代謝フラックス解析における課題、本論文の目的と構成について述べた。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。そして、大腸菌の代謝状態が、遊離アミノ酸の ^{13}C 標識情報に反映されるまでのダイナミクスについて解析した。この実験では、大腸菌を連続培養系で増殖させ、グルコースを ^{13}C 標識炭素源として与えた。そして、遊離アミノ酸の ^{13}C 標識情報のダイナミクスを解析し、それが定常となるまでの時間を明らかにした。その結果、タンパク質由来アミノ酸の標識時間が 25 時間であったのに対して、遊離アミノ酸の標識時間は酸

素供給量が多い条件では1時間未満、酸素供給量が少ない条件では最長15時間程度まで短くなった。また、得られた代謝フラックス分布は、従来のタンパク質由来アミノ酸の標識情報を利用した場合と同様であることを示した。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、遺伝子発現量を人為的に制御が可能な組換え大腸菌を用いて、代謝フラックスが変動する培養プロセスを構築した。そして、中間代謝物質の¹³C標識情報を用いた代謝フラックス解析の可能性を議論した。代謝フラックス解析は代謝的定常状態を仮定しており、今回の実験系では中間代謝産物量の変化はなく、標識情報は素早く更新され、定常に達すると判断した。そして、代謝フラックス解析の結果、人為的な遺伝子の発現量変化に伴う代謝変化を代謝フラックス解析によって初めて捉えることができた。最後に、第4章では本研究で得られた知見をまとめ、実生産における発酵プロセスへの本法の適用の可能性について議論した。

以降の章では、タンパク質由来アミノ酸を PAA、遊離アミノ酸を FAA、中間代謝産物を IM と略語で表記する。また、代謝産物についても同様に Appendix に記述した略語を用いる。

2章 遊離アミノ酸の¹³C 標識時間の解析

2-1 緒言

代謝フラックス解析は一般に、¹³C グルコースのような標識された基質を細胞に取り込ませ、代謝経路に依存した代謝産物の標識情報から代謝フラックスを求める。タンパク質は菌体構成成分の大部分を占めるために量的に多く、測定が行い易い。この利点から¹³C 標識情報を利用した代謝フラックス解析に利用され、従来法として確立されてきた。しかし、このタンパク質の量的な多さは、¹³C 基質由来の炭素がタンパク質由来アミノ酸 (PAA) の炭素に取り込まれ、定常に達するまでの時間の長さに直接的に関与する。例えば、細胞の増殖速度が 0.2 [h] の場合に数十時間と比較的長い時間スケールとなっている。このようなケースでは、ある時点の PAA の標識情報はその時点での代謝状態を反映しているだけでなく、数十時間前からサンプリングした瞬間までの代謝の状態を平均的に反映している。このようなことから、培養環境と比増殖速度を一定に保つことが可能な連続培養、比増殖速度が一定な状態 (対数増殖状態) にある回分培養について、PAA を用いたフラックス解析は適用されている。このように、標識基質の添加後から長時間の培養を必要とする PAA を利用する解析系は、定常を長期間保つことが可能な限られた実験条件に適応されているのが現状である。

このような欠点を克服する手段として、標識時間が短い時間で定常に達する中間代謝産物、遊離アミノ酸 (FAA) に基づく代謝フラックス解析が研究されている。標識時間の短さは細胞内蓄積量に依存しており、中間代謝産物の方が標識時間は数分程度と短いので有利に考えられる。しかし PAA に類似した測定系を利用可能なこと、この分析設備が中間代謝産物の測定設備より比較的安価なことから FAA に基づく解析も多く利用できる可能性を秘めている。従って、FAA の標識情報を用いた代謝フラックス解析の進展は十分に意義がある。このように有意義な FAA ではあるが、その標識のダイナミクスは PAA と比較してどのような性質を持つかは議論されておらず、それを用いた代謝フラックス解析がどのような特徴を持つか、適切に評価されているとは言い難い。

そこで本章では、この FAA の標識情報を用いた代謝フラックス解析に焦点を当て、¹³C 濃縮度が定常に至るまでのダイナミクスを PAA と比較すること、FAA の標識情報を利用した代謝フラックス解析を従来法と比較し、その代謝フラックス分布を評価することを目的とした。実験には、酸素供給量のみ異なる独立した 3 つの連続培養系を用い、モデル生物である大腸菌を培養した。そして、各環境条件において、PAA あるいは FAA の¹³C 濃縮度のダイナミクスを解析した。また、FAA の¹³C 濃縮度のダイナミクスが定常に至るまでの各時間点より、代謝フラックスを求め、それらを従来法である PAA から求めた代謝フラックスと比較した。

今回使用した連続培養は、比増殖速度や外部環境を一定にコントロールでき、解析を単純化できる利点を持つ。また、酸素供給量の変化は、FAA の ^{13}C 濃縮度のダイナミクスの性質を理解するために用意した。酸素供給量は、細胞増殖の重要な要因として知られており、細胞の代謝状態を大きく変える。このため、 ^{13}C 濃縮度のダイナミクスが定常となる時間に影響を与えることが推測された。

2-2 実験材料と実験方法

2-2-1 使用菌株

本章では、大腸菌の野生株である *Escherichia coli* MG1655 (F^λ *rph-1*)を用いた。

2-2-2 使用培地

大腸菌の培養には最少培地である M9 培地 (17.1 g/L Na₂HPO₄·12H₂O、3 g/L KH₂PO₄、0.5 g/L NaCl、2 g/L NH₄Cl、123 mg/L MgSO₄·7H₂O、2.78 mg/L FeSO₄·7H₂O、14.7 mg/L CaCl₂·2H₂O、10 mg/L Thiamin-hydrochloride、5 g/L glucose)を用いた (Vama and Palsson, 1994、Lee *et al.*, 1994)。また、菌体濃度および代謝産物の増加により粘性が増し、気泡が培養槽内に蓄積することで 5N アンモニア水による pH 制御を難しくする現象が発生するが、培地成分に消泡剤である 0.001 % アデカノールを加えることでこれを防いだ。

2-2-3 培養操作

2-2-3-1 前培養

本培養に向けて、坂口フラスコに 40 mL の M9 液体培地を用意し、そこに大腸菌を植菌して 37 °C、14 時間培養した。

2-2-3-2 連続培養実験

代謝フラックス解析を行うにあたり本研究では、グルコースを制限基質とした 3 系列の連続培養を行った。異なる酸素供給条件を作り出すために、それぞれの攪拌回転数を 100 rpm、400 rpm、800 rpm に設定した。その他の培養条件は共通しており、以下の通りである。

培地には、400 mL の M9 培地を使用した。前培養液を OD₆₀₀ = 0.1 となるように植菌して回分培養を開始した後、対数増殖期であり、また、培養液中のグルコースが残った状態にある培養 5 時間後に希釈率 0.2 h⁻¹ の連続培養に切り換えた。連続培養は、温度、pH、溶存酸素濃度制御システムを持つ 1 L ジャーファーマンター BMP type bioreactor (ABLE) を用いて行った。培養温度は、37 °C、また空気の通気量は、400 mL/min に設定した。pH は、5 N アンモニア水を添加することにより 7.0 に維持した。培養中は溶存酸素電極を用いて培養液中の溶存酸素濃度を、また排ガス分析計 OFF-GAS Jr. (ABLE) を用いて排ガス中の酸素と二酸化炭素濃度を測定した。一連の連続培養装置の全景を Fig. 2-1 に示す

2-2-3-3 ^{13}C 標識実験

連続培養において定常状態に達した後（7 滞留時間）、連続培養に切り換えるため、流入培地は ^{13}C 標識グルコースを含む M9 培地へと交換された。このとき 1- ^{13}C グルコースが 50 %、天然標識のグルコースが 50 % 存在する M9 培地を使用した。以降、本研究において ^{13}C を含む M9 培地を ^{13}C 培地、1- ^{13}C グルコースのことを ^{13}C グルコースと呼称する。



Fig. 2-1 構築した連続培養系

培養槽には一定量の M9 液体培地が存在し、酸素供給量、pH、そして温度が保たれた環境の下、菌体は培養されている。連続培養を行うため、培養槽には、希釈率 0.2 [h] で M9 培地が供給され、同量が廃液として排出される。

2-2-4 サンプリングとサンプル前処理

菌体濃度測定用サンプル、乾燥菌体重量用サンプル、有機酸などの培養液上清測定用サンプル、GC-MS 用タンパク質および遊離アミノ酸サンプルを適宜回収した。これらの前処理については後述する。

サンプリングは、 ^{13}C 培地へ交換以前、交換後ともに 5 時間間隔で行った。ただし、遊離アミノ酸サンプルに関しては ^{13}C 培地交換後、15 分後、30 分後、1 時間後、2 時間後、3 時間後、そして、4 時間後のサンプリングを加えて行った（15 分後、30 分後は、100 rpm、400 rpm のみ）。

2-2-4-1 菌体、菌体培地、培養液上清

菌体濃度、菌体の乾燥菌体重量、そして、有機酸などの代謝産物を測定するために培養液を回収した。菌体濃度の測定には、この培養液をそのまま用いた。次に、培養液を遠心分離（4 °C、15000 rpm、3 min）することで培養液上清を得た。また、同様の処理により分離された菌体を回収し、十分に乾燥させることで乾燥菌体重量用のサンプルとした。

2-2-4-2 タンパク質由来アミノ酸

菌体培地を遠心分離（4 °C、15000 rpm、3 min.）することにより菌体ペレットを得た後、0.9 % NaCl により、菌体を 2 回洗った。そして、菌体構成タンパク質を 6 M HCl を用いて 98 °C、24 時間反応させることでアミノ酸に加水分解した。菌体残渣を除くために、ポアサイズ 0.2 μm のフィルトレーションを行った後、遠心濃縮装置 Savant SpeedVac SPD1010 (Thermo Scientific) を用いて液体成分を完全に乾燥させた。そして、使用まで -80 °C で保存した。

2-2-4-3 遊離アミノ酸

培養液をポアサイズ 0.5 μm のフィルターを用いて、瞬時にろ過し、そのフィルターを 1.6 mL MeOH、1.6 mL chloroform、500 μL Milli-Q 水から成る抽出溶液に浸した (Winder *et al.*, 2008、Ohashi *et al.*, 2008、Taymaz-Nikerel *et al.*, 2009)。そして、1 分間激しく攪拌した後、超音波洗浄機を用いて 1 分間の超音波処理を行い、再び激しく攪拌を行うことで菌体内代謝産物を抽出した。次に、その混合液を遠心分離（4 °C、10000 rpm、15 min.）することで遊離アミノ酸や中間代謝産物を含む水層と脂質を含む疎水層、および菌体構成タンパク質である残渣を分離し、遊離アミノ酸と中間代謝産物が含まれる水層 1.6 mL を回収した。そして、これを遠心濃縮装置により完全に乾固させ、200 μL の Milli-Q 水に再溶解させた後、残った成分を遠心分離（4 °C、15000 rpm、3 min）した。最後に、上清を回収し、完全に乾燥させた後、使用まで -80 °C で保存した。

2-2-5 各種成分の測定

代謝状態の確認、および、代謝フラックス解析のために菌体濃度や酸素量、そして代謝産物等の濃度を測定した。溶存酸素量、排ガス成分はオンラインで測定し、その他の成分はオフラインで測定した。

2-2-5-1 菌体濃度

紫外可視分光光度計 UVmini-1240 (Shimadzu) を用いて波長 600 nm における培養液の濁度を測定した。

2-2-5-2 グルコース濃度

バイオセンサ BF-5 (OSI)を用いて、酵素電極法により培養液中の残存グルコース濃度を測定した。

2-2-5-3 有機酸濃度

本研究では、HPLC Prominence (Shimadzu) を用いて培養上清サンプルの有機酸濃度(乳酸、酢酸、ギ酸、コハク酸)を測定した。定量方法に関しては内部標準法を採用した。内部標準物質として終濃度が 10 mM となるようにピメリン酸を培養液サンプルと検量線作成用の標準試薬溶液に添加した。分析には、カラム TSKgel column (Oapak-A; 7.8 mm ID × 30 cm ; TOSOH, Japan) を使用した。そして、溶離液として 0.75 mM H₂SO₄ を用い、0.8 mL/min の流速で送液した。サンプル注入量は 20 μl とし、カラムはカラムオープンを用いて 60 °C に保持した。検出には波長 210 nm における紫外光の吸収を利用した。

2-2-5-4 エタノール濃度

ガスクロマトグラフ Agilent 7890 GC (Agilent Technologies, Japan) を用いて培養上清サンプル中のエタノール濃度を測定した。定量方法として内部標準法を採用した。内部標準物質として終濃度が 0.05 % となるように 3-methyl-1-butanol をサンプルと検量線作成用の標準試薬溶液に添加した。

分析にはキャピラリーカラム(Restek 10657 Stabiliwax; 60 m × 0.32 mm ID × 1 μm; Shimadzu GLC, Japan) を使用した。キャリアガスにはヘリウムガスを用いた。サンプル注入量は 1 μl であり、スプリット比は 1:10 とした。キャリアガスにより 6.5 ml/min の流速でカラム内に流し、カラムは 80 °C で 2 分間保持し、10 °C/min で 150 °C まで昇温させた後、3 分間保持した。検出には FID (Flame Ionization Detector) を利用した。

2-2-5-5 酸素比消費速度

攪拌回転数が 800 rpm の連続培養では、排ガス分析計により測定した排ガス中の酸素濃度から酸素比消費速度を直接求めた。一方、攪拌回転数が 100 rpm と 400 rpm の連続培養において、酸素比消費速度はその条件下におけるジャーフェーマンターの酸素移動容量係数 (K_{La}) に基づいて算出した。

K_{La} の測定方法として、式 2-1 に表される Gassing out method (Static Method) を使用した (Wise, 1951)。

$$\ln \frac{C^* - C_{ini}}{C^* - C_L} = K_{La} \times t$$

式 2-1

ここで、 C^* は飽和溶存酸素濃度 [mg/L]、 C_{ini} は初期溶存酸素濃度 [mg/L]、 C_L は測定溶存酸素濃度 [mg/L]、 t は時間 [h] を表す。さらに K_{La} を含んだ式 2-2 に実際の培養結果から得られた数値を代入することで酸素比消費速度を求めた。

$$OUR = \frac{K_{La} (C_{ini} - C)}{X}$$

式 2-2

ここで、OUR は酸素比消費速度 [mg/gDW/h]、 X は菌体濃度 [gDW/L] を表す。

2-2-5-6 乾燥菌体重量

精密電子天秤を用いて、十分に乾燥した菌体の重量を定量した。

2-2-6 GC-MSによるアミノ酸分析

GC-MS 分析は、ガスクロマトグラフ質量分析計 Agilent 7890A GC、5975C Gas Chromatograph/Mass Selective Detector (Agilent Technologies) を用いて行った。

2-2-6-1 サンプル誘導体化

GC-MS 分析においては、測定対象がアルコールのような揮発性物質に限定されるため、アミノ酸のような揮発性のない物質は沸点を低下させるために官能基の誘導体化を必要とする。本研究では、*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide を用いてアミノ酸を *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) 化し、GC-MS 分析に供した。抽出した菌体構成タンパク質由来のアミノ酸および遊離のアミノ酸をアセトニトリルに溶解させた。そしてアセトニトリルに溶解させたアミノ酸溶液と *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide を 1 : 1 で混合し、105 °C で 60 分間反応させることにより、アミノ酸を TBDMS 化させた (Fig. 2-2)。

2-2-6-2 分析条件と測定

カラムはキャピラリーカラム(DB-5MS+DG; 30 m × 0.25 mm ID × 0.25 μm; Agilent Technologies) を使用し、キャリアガスにはヘリウムガスを用いて 1 ml/min の流速でカラム内に流した。サンプル注入量は 1 μl であり、スプリット比は 1:10 とした。オーブンの昇温設定は、150 °C で 2 分間保持した後、3 °C/min で 270 °C まで昇温させた。それから、300 °C まで 10 °C/min で昇温させた後、5 分間保持することでカラムに吸着した多成分を単一のピークとして溶出させた。質量分析部については、インターフェイスは 250 °C、イオン源は 230 °C、GC 部より分離された単一成分をイオン化する電子イオン化 (EI 法; Electron impact method) の電圧は 70 eV とした。

誘導体化された各種アミノ酸を含むサンプルは、キャピラリーカラムによって単一成分に分離され、EI 法によってイオン化される。このイオン化の際、誘導体化アミノ酸は、その質量電荷比を *M* とすると質量電荷比が *M*-15、*M*-57、*M*-85、*M*-159 および 302 のフラグメントイオン (*M*302) に開裂することが知られている (Mawhinney *et al.*, 1986、Chaves and Vasconcelos, 1987)。また、質量分析にあたり、Selected Ion Monitoring (SIM) モードを用いて各種アミノ酸に由来するマススペクトルのアバンダンスを定量した。一般に、質量分析計では単位時間に広い質量範囲を走査する Scan モードと、設定した特定の質量範囲を走査する SIM モードがある。前者は広範な質量のマススペクトルを得られ、既知のマススペクトルとの比較を行うことで未同定物質の同定といった定性分析に使用される。一方、後者は測定質量数が特定されており、設定した質量数の範囲に対する測定ポイント数が Scan モードよりも多く、定性分析に向いている。従って、本研究では SIM モードで測定することにより、Fig. 2-3 に示されるマススペクトルより構成されるクロマトグラムを取得した。

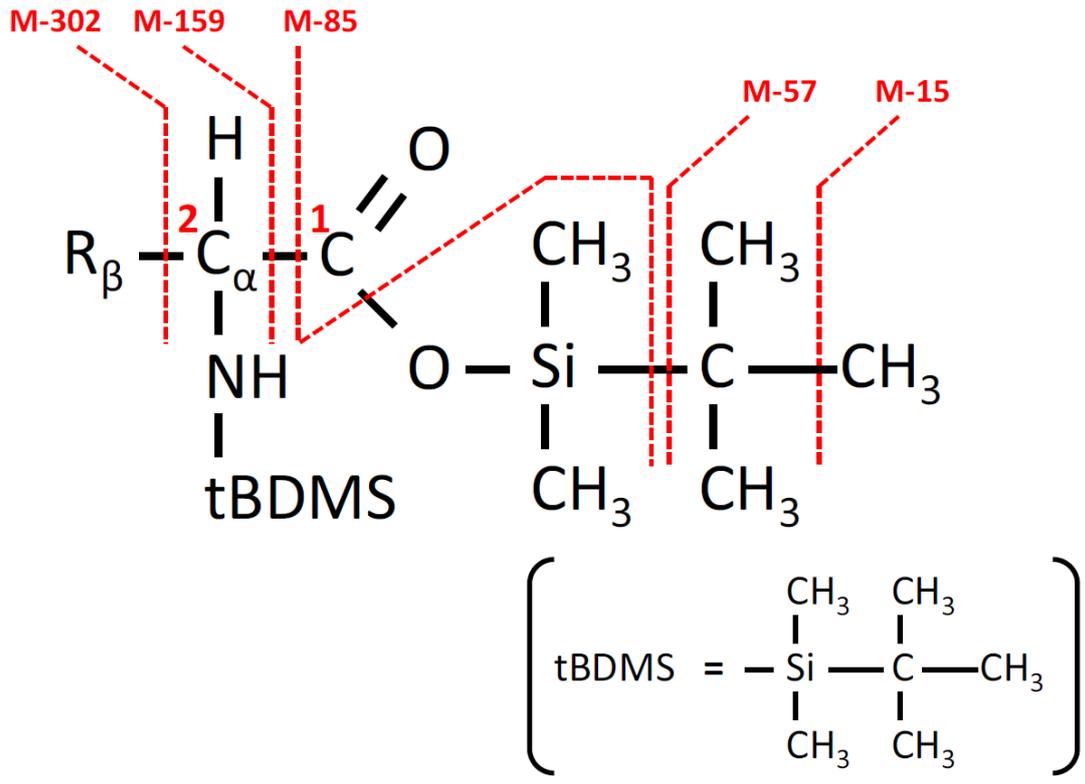


Fig. 2-2 アミノ酸の誘導体化とフラグメント化

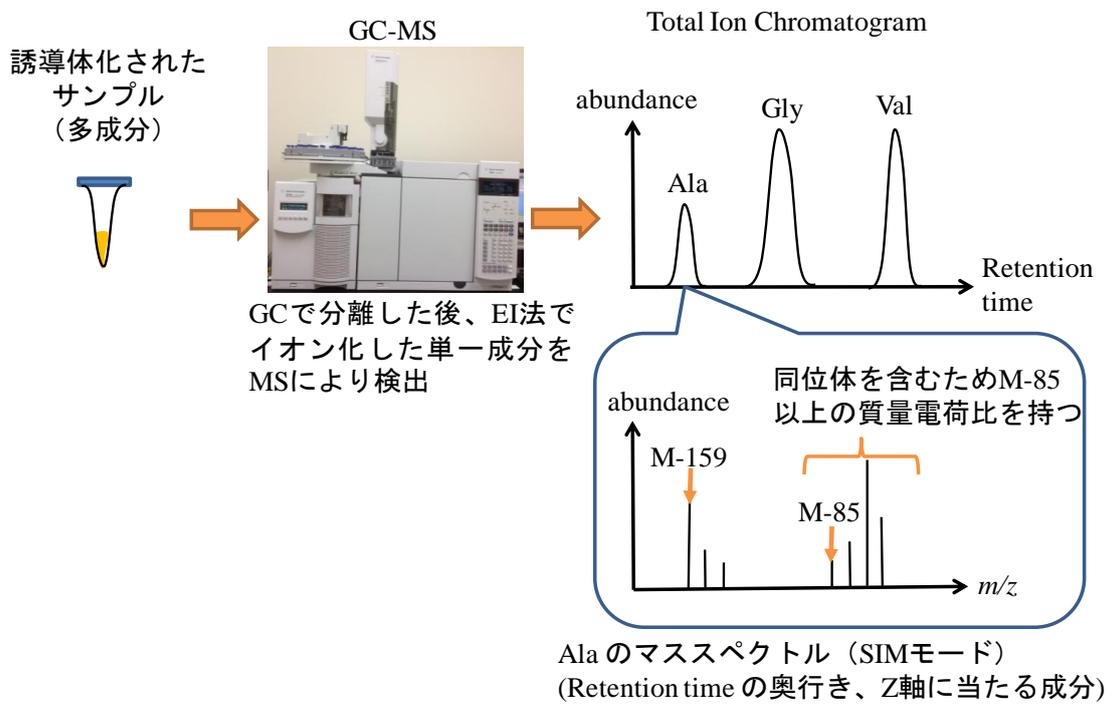


Fig. 2-3 GC-MS で得られるクロマトグラムとマススペクトル

2-2-7 代謝フラックス解析

2-2-7-1 ^{13}C 濃縮度の算出

代謝フラックス解析においては、GC-MSにより測定したアミノ酸のフラグメントイオンの ^{13}C 濃縮度データと推定されたフラックス分布から求められるアミノ酸のフラグメントイオンの ^{13}C 濃縮度とを比較する。炭素数 n のフラグメントイオンの質量数を M とすると、通常 ^{13}C で標識されることにより質量数 M 、 $M+1$ 、 $M+2$ 、 \dots 、 $M+n$ のフラグメントイオン（同位異性体と呼ぶ）が存在することとなる。このフラグメントイオンの存在割合を ^{13}C 濃縮度とし、各代謝産物のマススペクトルの値から算出した（Fig. 2-4）。その際、マススペクトルから ^{13}C 濃縮度を得る手法としては積分法を用いた（Shirai *et al.*, 2006）。

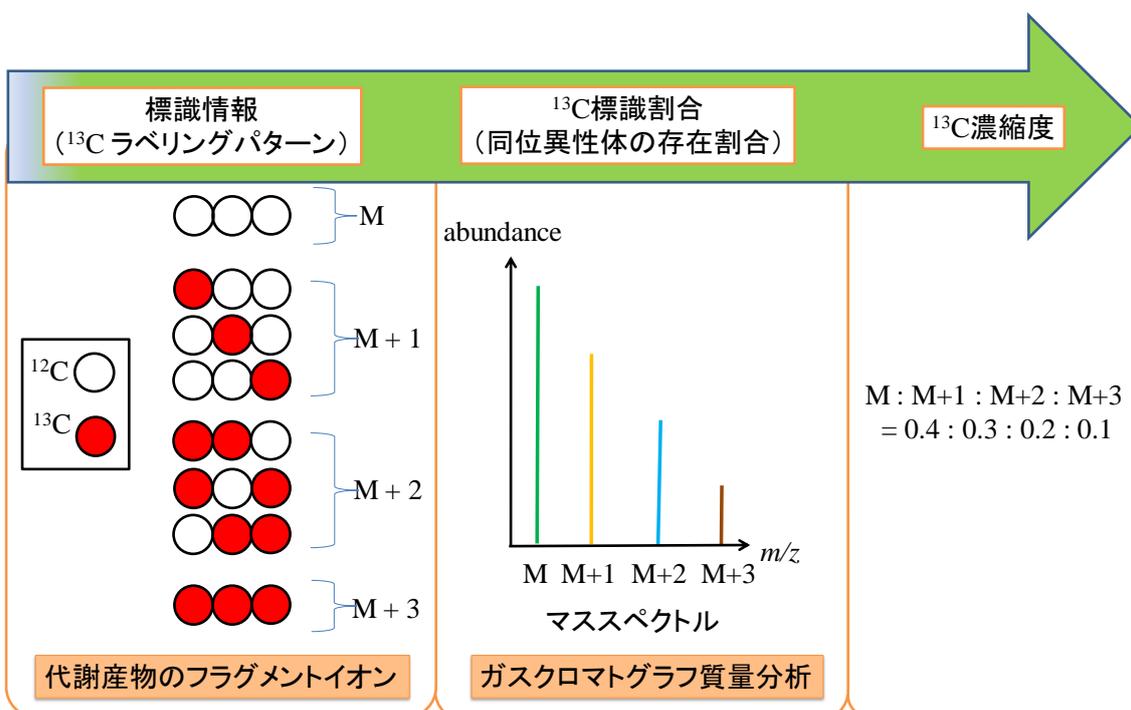


Fig. 2-4 代謝産物の標識情報から ^{13}C 濃縮度への変換

各代謝産物は細胞の代謝状態に依存した ^{13}C による標識情報を持つ。その標識情報は各同位異性体由来である。その存在割合は、質量分析器を用いることで得ることができる。この同位異性体の存在割合（標識割合）を ^{13}C 濃縮度として、代謝フラックス解析に利用する。図では炭素数が3つのフラグメントイオンを例に挙げている。

2-2-7-2 ^{13}C 濃縮度の天然同位体含量の補正

遊離アミノ酸などのマススペクトルのデータには ^{13}C 標識基質に由来する ^{13}C だけでなく、Table 2-1 に示すようにアミノ酸や誘導体化試薬を構成するすべての元素 (C、H、N、O、S、Si) についても天然に存在する同位体が含まれるため、Rosman らの報告に従い、その影響を取り除いた (Rosman and Taylor, 1998)。

Table 2-1 有機物を構成する主要な元素の同位体構成比

元素	M	M+1	M+2	M+3
H	0.999885	0.000115		
C	0.9893	0.0107		
N	0.99632	0.00368		
O	0.99757	0.00038	0.00205	
Si	0.922297	0.046832	0.030871	
S	0.9493	0.0076	0.0429	0.0002

M は各元素の質量数は表し、M+1 と増える毎に本来よりも質量数の大きい同位異性体であることを意味する。

構成元素数が少ないギ酸 (HCOOH) を例に補正方法を説明する。ギ酸の質量数を M とすると、ギ酸は炭素を一つ含むため、炭素による質量数の変化は理論的に M 、 $M+1$ の 2 パターンのみである。このような質量数の存在割合 m_0 、 m_1 を要素とするベクトルを MDV (Mass Distribution Vector) と定義すると補正後のギ酸の MDVcorr は式 2-3 のように表せる。先述した ^{13}C 濃縮度は、この MDV に当たる。

$$MDVcorr = \begin{bmatrix} m_0 \\ m_1 \end{bmatrix}$$

式 2-3

一方で、実際に GC-MS で測定されるギ酸の同位異性体は、質量数が M から $M+7$ ままで存在する。この存在割合を m_0 、 m_1 、 m_2 、 \dots 、 m_7 とし、GC-MS 分析の実測値を MDVraw として定義する (式 2-4)。

$$MDVraw = \begin{bmatrix} m_0 \\ m_1 \\ m_2 \\ m_3 \\ m_4 \\ m_5 \\ m_6 \\ m_7 \end{bmatrix}$$

式 2-4

また、式変換の都合上、2-3 式の列の要素に 0 を加えることにより、8 つにする。すなわち、

$$MDVcorr = \begin{bmatrix} m_0 \\ m_1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

式 2-5

とする。そして、以下の述べる同位体存在比の影響を表現する行列を CM と置くと、MDVraw を CM と MDVcorr で次のように表すことができる。

$$MDVraw = CM \times MDVcorr$$

式 2-6

ギ酸は水素を2つ含む。 ^1H と ^2H の存在確率を p_{H} 、 q_{H} とする場合、補正行列 CM_{H} は以下のようになる

$$\text{CM}_{\text{H}} = \begin{bmatrix} p_{\text{H}}^2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2p_{\text{H}}q_{\text{H}} & p_{\text{H}}^2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ q_{\text{H}}^2 & 2p_{\text{H}}q_{\text{H}} & p_{\text{H}}^2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & q_{\text{H}}^2 & 2p_{\text{H}}q_{\text{H}} & p_{\text{H}}^2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & q_{\text{H}}^2 & 2p_{\text{H}}q_{\text{H}} & p_{\text{H}}^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & q_{\text{H}}^2 & 2p_{\text{H}}q_{\text{H}} & p_{\text{H}}^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & q_{\text{H}}^2 & 2p_{\text{H}}q_{\text{H}} & p_{\text{H}}^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & q_{\text{H}}^2 & 2p_{\text{H}}q_{\text{H}} & p_{\text{H}}^2 \end{bmatrix}$$

式 2-7

また、炭素と水素以外に、酸素を2つ含むため、 ^{16}O 、 ^{17}O 、そして ^{18}O の存在確率を p_{O} 、 q_{O} 、そして s_{O} とする場合、補正行列 CM_{O} は以下のようになる。

$$\text{CM}_{\text{O}} = \begin{bmatrix} p_{\text{O}}^2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2p_{\text{O}}q_{\text{O}} & p_{\text{O}}^2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ q_{\text{O}}^2 + 2p_{\text{O}}s_{\text{O}} & 2p_{\text{O}}q_{\text{O}} & p_{\text{O}}^2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2q_{\text{O}}s_{\text{O}} & q_{\text{O}}^2 + 2p_{\text{O}}s_{\text{O}} & 2p_{\text{O}}q_{\text{O}} & p_{\text{O}}^2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ s_{\text{O}}^2 & 2q_{\text{O}}s_{\text{O}} & q_{\text{O}}^2 + 2p_{\text{O}}s_{\text{O}} & 2p_{\text{O}}q_{\text{O}} & p_{\text{O}}^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & s_{\text{O}}^2 & 2q_{\text{O}}s_{\text{O}} & q_{\text{O}}^2 + 2p_{\text{O}}s_{\text{O}} & 2p_{\text{O}}q_{\text{O}} & p_{\text{O}}^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & s_{\text{O}}^2 & 2q_{\text{O}}s_{\text{O}} & q_{\text{O}}^2 + 2p_{\text{O}}s_{\text{O}} & 2p_{\text{O}}q_{\text{O}} & p & 0 \\ 0 & 0 & 0 & s_{\text{O}}^2 & 2q_{\text{O}}s_{\text{O}} & q_{\text{O}}^2 + 2p_{\text{O}}s_{\text{O}} & 2p_{\text{O}}q_{\text{O}} & p_{\text{O}}^2 \end{bmatrix}$$

式 2-8

これより、先の式 2-6 は次のように書き換えられる。

$$\text{MDVrow} = \text{CM}_{\text{H}} \times \text{CM}_{\text{O}} \times \text{MDVcorr}$$

式 2-9

従って、 MDVcorr について書き直すと式 2-10 となる。

$$\text{MDVcorr} = \text{CM}_{\text{H}}^{-1} \times \text{CM}_{\text{O}}^{-1} \times \text{MDVrow}$$

式 2-10

アミノ酸は、さらにケイ素と窒素が含まれるため、式 2-11 のようになる。

$$\text{MDVcorr} = \text{CM}_{\text{H}}^{-1} \times \text{CM}_{\text{O}}^{-1} \times \text{CM}_{\text{Si}}^{-1} \times \text{CM}_{\text{N}}^{-1} \times \text{MDVrow}$$

式 2-11

2-2-7-3 代謝反応モデル

代謝フラックス分布を求める代謝反応モデルを Fig. 2-5 および Table 2-2 に示した。この代謝反応モデルには解糖系、TCA サイクル、ペントースリン酸経路、エントナー・ドウドロフ経路 (ED 経路; Entner-Doudoroff pathway) が含まれる。

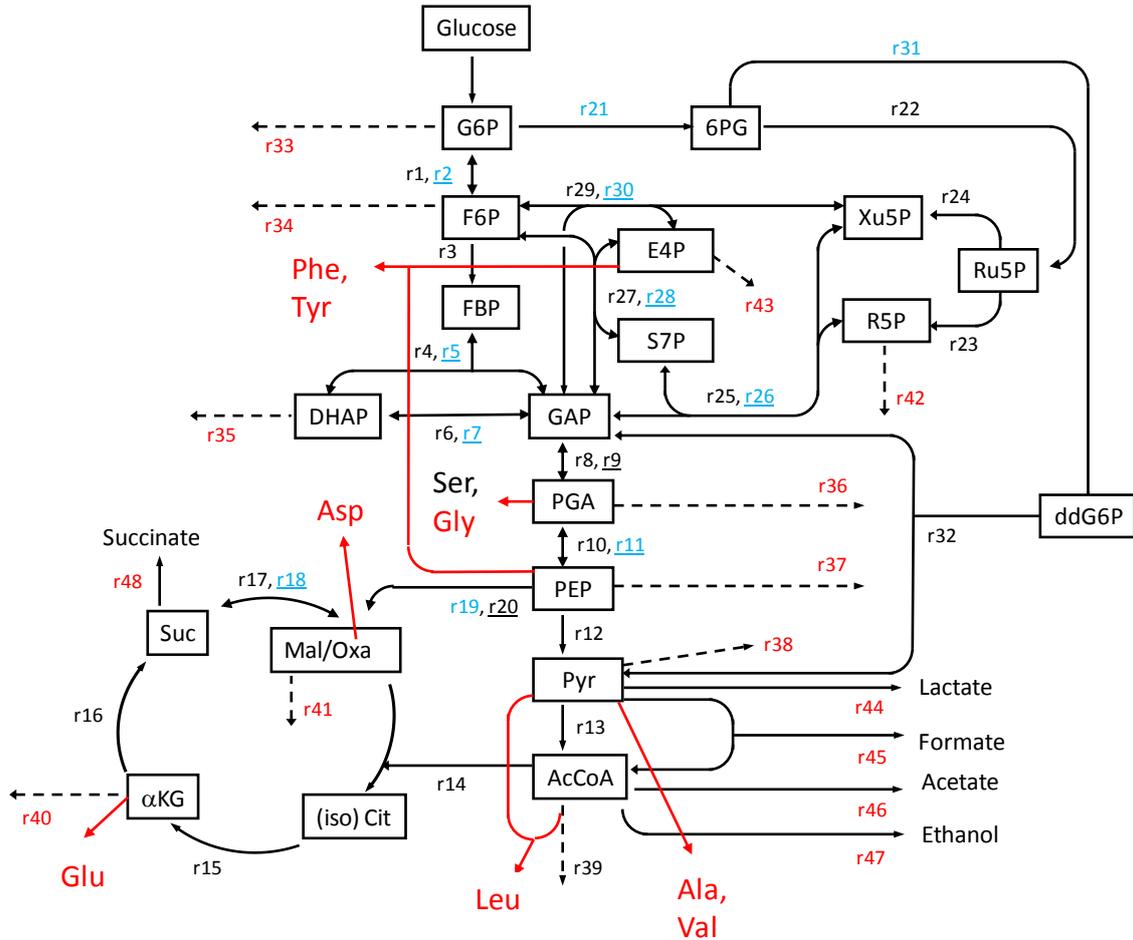


Fig. 2-5 大腸菌の代謝モデル

解糖系、TCA サイクル、ペントースリン酸経路、ED 経路を代謝経路として含んでいる。リアクション No. が2つあるものに関しては下線で示される逆反応があることを意味し、リアクション No. の個々の反応は Table 2-2 に示した。赤線は、代謝フラックス解析の入力情報であるアミノ酸と前駆体の関係を示している。測定できなかったアミノ酸は含まれない。また、解析に用いなかったアミノ酸は黒色とした。また、黒破線部分の赤色のリアクション No. は菌体構成成分を示し、黒実線部分の赤色のリアクション No. は有機酸などである。共に系外へ抜け出た物質であり、実測値より求められる解析に使用した入力値である。一方、青色のリアクション No. が求めるべき代謝フラックスであり、この代謝フラックスが決定されると他の代謝フラックスを決定できる。

Table 2-2 大腸菌の代謝反応モデル

Flux num	Reaction	Flux num	Reaction
r1	G6P --> F6P	r25	R5P + Xu5P --> S7P + GAP
r2	F6P --> G6P	r26	GAP + S7P --> Xu5P + R5P
r3	F6P --> FBP	r27	GAP + S7P --> F6P + E4P
r4	FBP --> DHAP + GAP	r28	E4P + F6P --> S7P + GAP
r5	DHAP + GAP --> FBP	r29	E4P + Xu5P --> F6P + GAP
r6	DHAP --> GAP	r30	GAP + F6P --> Xu5P + E4P
r7	GAP --> DHAP	r31	6PG --> dd6PG
r8	GAP --> PGA	r32	dd6PG --> Pyr + GAP
r9	PGA --> GAP	r33	G6P --> Biomass
r10	PGA --> PEP	r34	F6P --> Biomass
r11	PEP --> PGA	r35	DHAP --> Biomass
r12	PEP --> Pyr	r36	PGA --> Biomass
r13	Pyr --> AcCOA + CO2	r37	PEP --> Biomass
r14	AcCOA + Mal/Oxa --> IsoCit	r38	Pyr --> Biomass
r15	Iso(Cit) --> aKG + CO2	r39	AcCOA --> Biomass
r16	aKG --> Suc + CO2	r40	aKG --> Biomass
r17	Suc --> Mal/Oxa	r41	Mal/Oxa --> Biomass
r18	Mal/Oxa --> Suc	r42	R5P --> Biomass
r19	PEP + CO2 --> Mal/Oxa	r43	E4P --> Biomass
r20	Mal/Oxa --> PEP + CO2	r44	Pyr --> [Lactate]
r21	G6P --> 6PG	r45	Pyr --> AcCOA + [Formate]
r22	6PG --> Ru5P + CO2	r46	AcCOA --> [Acetate]
r23	Ru5P --> R5P	r47	AcCOA --> [EtOH]
r24	Ru5P --> Xu5P	r48	Suc --> [Succinate]

括弧は、Biomass と同様に、代謝経路の系外へ抜ける物質を意味する。

2-2-7-4 代謝フラックス解析のアルゴリズム

ランダムに与えた代謝フラックスから計算的に予測された GC-MS データを作成し、実測によって得られた値に近づくように代謝フラックスをフィッティングさせる。これにより、実測値である GC-MS データを説明することができる代謝フラックス分布を得ることができる。代謝フラックス解析の算出アルゴリズムを Fig. 2-6 に示した。

^{13}C 代謝フラックス解析において、細胞内の代謝状態は定常状態にあると仮定した。従って、全ての中間代謝産物量は単位時間あたりの変化はないとみなし、全中間代謝産物の物質収支式を式 2-12 のように構築した (Vallino and Stephanopoulos, 1993)。

$$\frac{d(\text{Metabolite})}{dt} = r_{\text{synthesis}} - r_{\text{consumption}} = 0$$

式 2-12

ここで、 $r_{\text{synthesis}}$ と $r_{\text{consumption}}$ はそれぞれ流入フラックスと流出フラックスを意味しており、単位時間あたりの中間代謝産物の量に変化はない。さらに、代謝物質間での炭素原子の移動を表現するために考案された Isotopomer distribution vector (IDV) と Isotopomer mapping matrix (IMM) を利用して全中間代謝産物の炭素原子に関する収支式を構築した (Schmidt *et al.*, 1997)。IDV と IMM はそれぞれ、各分子の個々の同位体異性体の ^{13}C ラベリングパターン、および反応物と生産物間における各炭素原子の収支を表現するマトリクスとして定義されている (Fig. 2-7)。この IDV と IMM に基づいて、可能性のある全ての代謝産物中の炭素原子に関わる収支式を構築した。

これらの収支式とランダムに与えられた代謝フラックス (r_i) から、Levenberg-Marquardt 法を用いることで解析的に予測 IDV を求めた。そして、この予測 IDV を MDV に変換し (Fig. 2-8)、GC-MS により実測した MDV との残差二乗和 (RSS) を求めた (式 2-13)。

$$\text{RSS} = \sum \left\{ \frac{\text{MDV}_{\text{sim}} - \text{MDV}_{\text{exp}}}{\text{MDV}_{\text{sim}}} \right\}^2$$

式 2-13

ここで MDV_{sim} は代謝フラックスから推定される MDV、 MDV_{exp} は GC-MS により実測した MDV を表す。本研究では、解析に用いたすべてのアミノ酸のフラグメントイオンに対して両者の差を二乗し、それらを合計することで RSS を求めた。そして、この値が大きい場合には r_i を与えなおし、残差二乗和が十分に小さくなったとき、 r_i を求めたい代謝フラックスとした。計算には Matlab ver. 7.9. (MathWorks) を用いた。

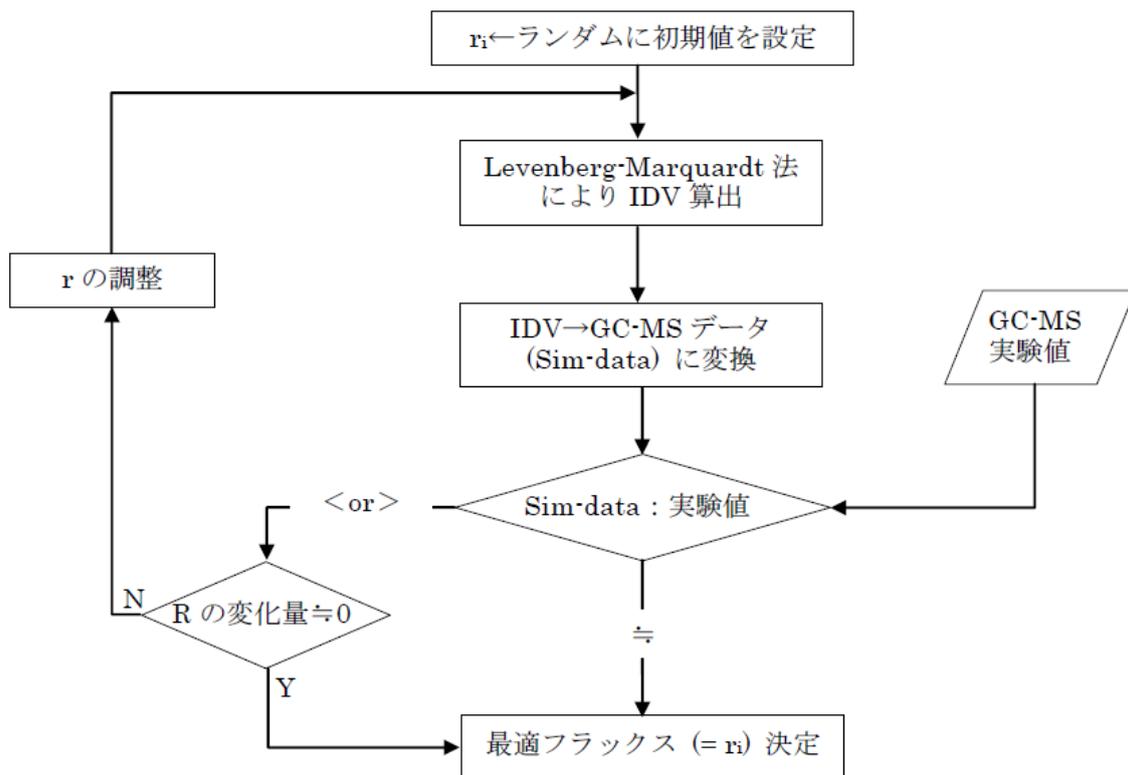
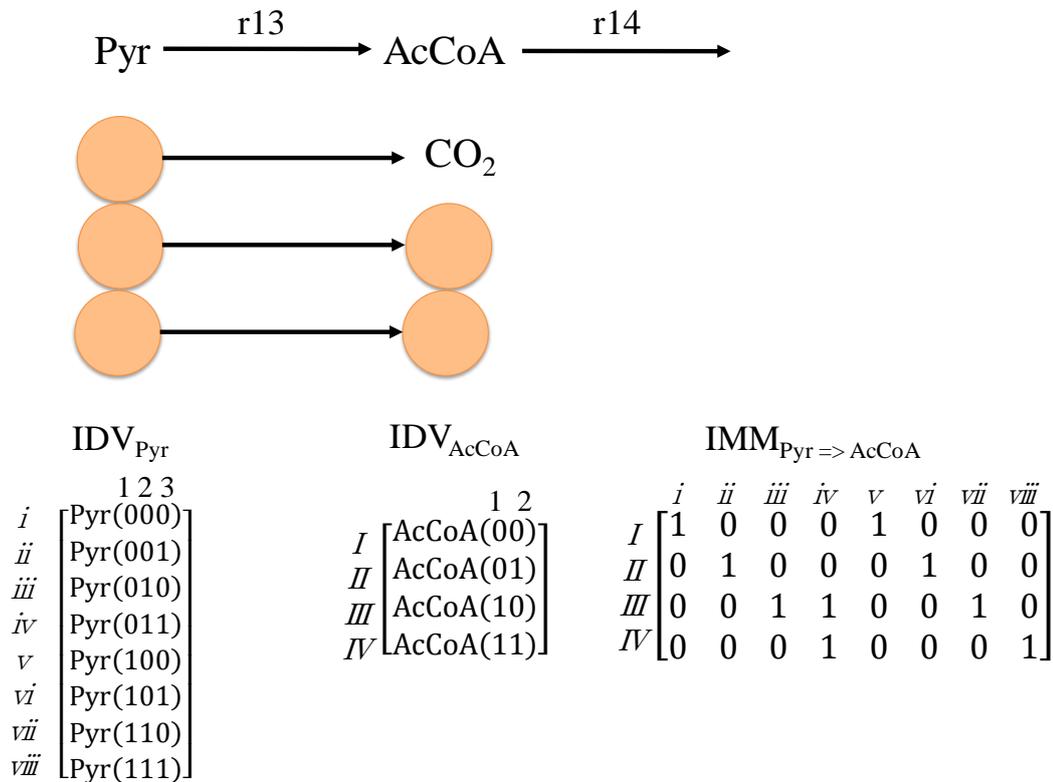


Fig. 2-6 代謝フラックス算出のアルゴリズム

ランダムに与えられた代謝フラックスから推測値である GC-MS データを作成するには、モデルに含まれる中間代謝産物の物質収支式だけでなく、反応間の個々の炭素の収支も考慮する必要がある。そのために IDV と IMM を導入することでそれらを求めた。計算された IDV からアミノ酸の MDV を求め、実測値との比較を行う作業を繰り返し、最適なフラックス値を算出する。



$$r13 \times (\text{IMM}_{\text{Pyr} \Rightarrow \text{AcCoA}} \times \text{IDV}_{\text{Pyr}}) - r14 \times \text{IDV}_{\text{AcCoA}} = 0$$

Fig. 2-7 炭素原子の移動を考慮に入れた AcCoA の物質収支式

Pyruvate (Pyr) から acetyl-coenzymeA (AcCoA) の反応を例としている。IDV は炭素の標識情報のベクトルであり、炭素数は 3 つなので、8 通りのパターンがある。一方、 $\text{IMM}_{\text{Pyr} \Rightarrow \text{AcCoA}}$ は AcCoA のそれぞれの IDV が Pyr のどの IDV から成り立つのかを表す。

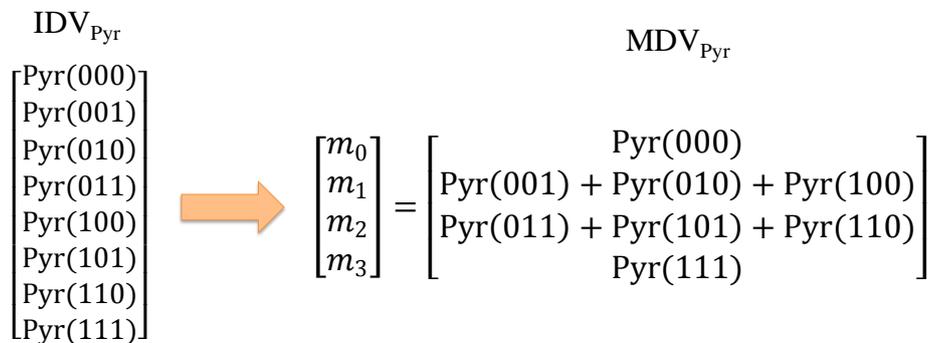


Fig. 2-8 Pyr の IDV と MDV の関係の模式図

2-3 結果と考察

2-3-1 大腸菌の連続培養実験

遊離アミノ酸 (FAA) とタンパク質由来アミノ酸 (PAA) の ^{13}C 濃縮度が定常に至るまでの時間が、どの程度時間が異なるのかを定量的に明らかにするため、攪拌回転数が異なる3つの独立した連続培養を行った。各攪拌回数を 800 rpm、400 rpm、100 rpm に設定した結果、培養が定常状態にあるときの大腸菌の酸素取り込み速度は、それぞれ 7.3 mmol/gDW/h、6.5 mmol/gDW/h、そして、2.3 mmol/gDW/h と異なる値となった。この代謝的定常状態におけるグルコース比消費速度と有機酸及びエタノールの比生産速度を Fig. 2-9. に示した。条件毎に各比速度は著しく変化する結果となった。

一般に、生物は中央代謝経路から生産される NADH を酸化することによって細胞内の酸化還元バランスを維持している。これは大腸菌にも当てはまり、好氣的な条件では細胞膜に存在する ATP 合成酵素を用いて NADH の酸化と ATP 合成を共役させて多量のエネルギーを得ている。一方、嫌氣的な条件においては細胞膜での NADH の効率的な酸化を行えないため、エタノール、コハク酸、そして、乳酸等の生産と NADH の酸化を共役させる。これにより、細胞内の酸化還元バランスを維持すると同時に解糖系や酢酸生産に由来するわずかな ATP を得ている。

今回、100 rpm の結果をみると、基質由来の炭素の一部はコハク酸とエタノールへ、大部分がギ酸と酢酸へ変換され、乳酸へはほとんど変換されなかった。細胞の酸化還元バランスの観点から見ると、細胞膜での効率的な NADH の酸化が行えず、代わりにコハク酸とエタノールの合成によって NADH を酸化していると考えられる。また、同様に NADH の酸化を担う乳酸合成が行われなかった理由として、酸化の効率が挙げられる。NADH に関わる知見として、1 mol のピルビン酸が 1mol のエタノール、もしくはコハク酸を生産するのに 2 mol の NADH を酸化するのに対して、1mol の乳酸を生産する際は NADH を 1 mol しか酸化しないことが知られている (Berríos-Rivera *et al.*, 2004)。NADH の効率的な酸化のために乳酸ではなく、エタノールとコハク酸の合成が行われたと考えられる (Fig. 2-10) (Alexeeva *et al.*, 2003)。また、酢酸の生成は NADH の酸化には関わらないものの ATP の合成に関わり、嫌氣的な条件における重要な ATP 合成経路となる。従って、これらの NADH の酸化経路、ATP 合成経路が機能していることから 100 rpm (酸素取り込み量 2.3 mmol/gDW/h) は微好気環境に対応すると考えられる。また、バイオマス生産フラックスを最大化する条件下で計算される、ゲノムスケール代謝モデルを用いたフラックスバランス解析によって、大腸菌の微好気環境でのこれらの物質の生産は支持されている (Fist *et al.*, 2007)。対照的に、800 rpm (酸素取り込み量 7.3 mmol/gDW/h) における有機酸の比生産速度は相対的に小さいか、測定下限値を下回るものであった。このことは、細胞膜での効率的な NADH の酸化と十分な ATP 合成が行えた環境に大腸菌が置かれ、その生育環境が好氣的であったことを示唆する。また、400

rpm（酸素取り込み量 6.5 mmol/gDW/h）は若干量のギ酸と酢酸の合成、コハク酸とエタノールの生産がなかった。このことから、両者の中間、もしくは 800 rpm に近い代謝状態にあったと考えられ、3 条件の酸素取り込み速度の量的な関係にも一致する。以上の結果より、異なる酸素供給量を適用したことで大腸菌の連続培養の挙動を変化させることができた。以降では、これら代謝状態が異なる条件における FAA、または PAA の ^{13}C 濃縮度のダイナミクスについて議論してゆく。

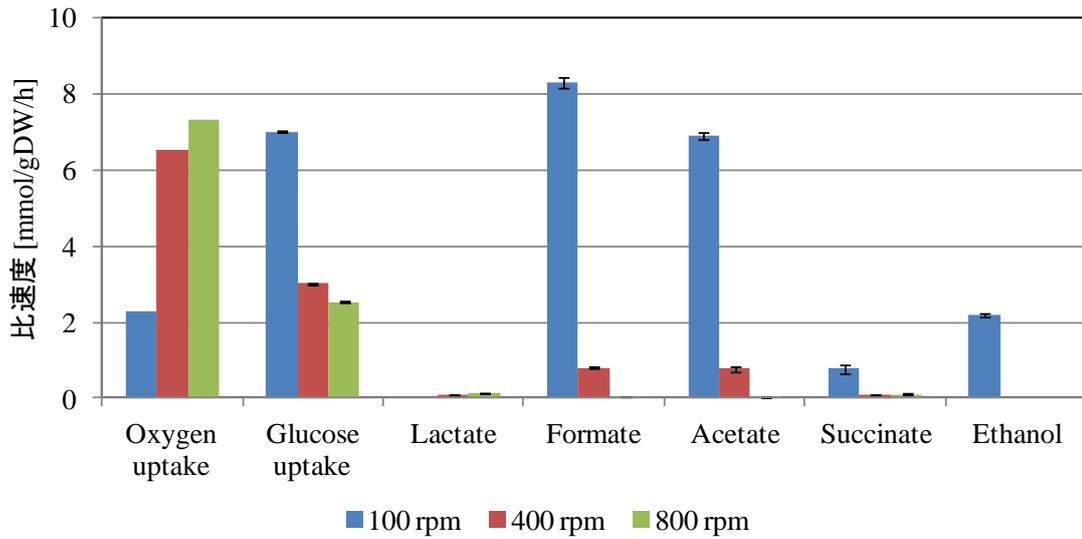


Fig. 2-9 グルコース比消費速度と有機酸およびエタノールの比生産速度
単位は mmol/gDW/h であり、括弧内のエラーバーは測定の標準偏差である。

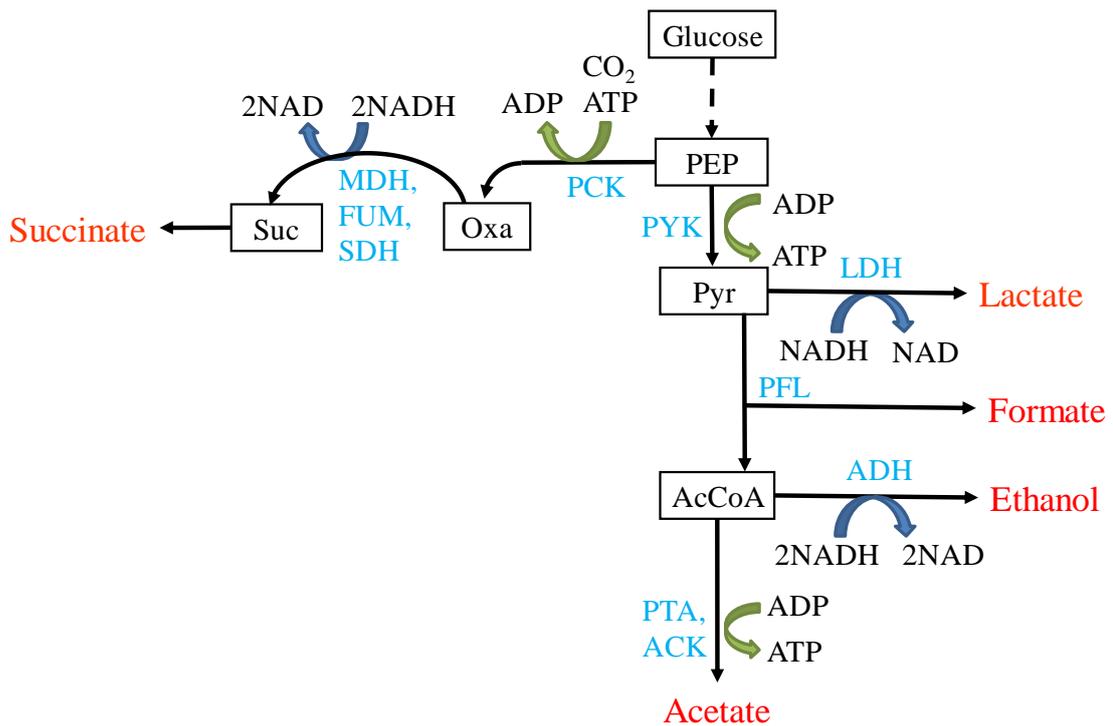


Fig. 2-10 嫌気条件における NADH と ATP 生産

赤字は最終代謝産物であり、青字は関わる酵素である。ピルビン酸デヒドロゲナーゼによって触媒される Pyr から AcCoA の生産に関しては、好気条件において活性を持つため除いている。略字は Appendix 参照。

2-3-2 タンパク質由来アミノ酸と遊離アミノ酸の¹³C濃縮度経時変化

¹³C代謝フラックス解析では、代謝産物の安定した標識情報を用いて代謝フラックスを求める。一般に、PAAの標識情報は測定しやすい利点があるが、定常に至るまでの時間が長い欠点があった。このような欠点は適用範囲を限定することに繋がり、より標識時間の短いFAA¹³C濃縮度を用いる手法が考案されている。先行研究において¹³C濃縮度のダイナミクスを追従する類似した解析をToyaらが報告している(Toya *et al.*, 2010)。しかし、どのような環境に対しても言えるのかどうか、定量的にどの程度時間が変化するかはこれまでに議論されていない。そこで、本研究では¹³C濃縮度が定常に達するまでの時間を明らかにすることを目的として、¹³C濃縮度のダイナミクスを追った。先行研究によっては、定常に達する以前の¹³C濃縮度の変化量から定常時の値を見積もる手法が報告されている(van Winden *et al.*, 2001, Syed *et al.*, 2009)。しかし、本研究では、¹³C濃縮度が定常に至るまでの時間を定量することを目的としているため、実測値を使用した。サンプリング時間に関しては、後述するようにその¹³C濃縮度が定常に至る時間が長いタンパク質を基準とした。¹³C標識されたグルコースに由来する炭素がタンパク質の99%を占めるまでの時間、つまり、標識グルコース添加から¹³C濃縮度が定常に達する25時間後まで培養を行った。

¹³Cグルコース添加直後からの¹³C標識同位体を取り込まれた(M+1、M+2、・・・、M+n)、もしくは¹³C標識同位体を取り込まれていない(M)、PAAとFAAの¹³C濃縮度のダイナミクスをFig. 2-11と12に示した。PAAとFAAの¹³C濃縮度のM、M+1等の成分の値は¹³Cを含んだ供給培地へ交換した直後から変化を始め、長くとも培養数十時間後にはその値は収束し、定常状態に到達することが分かった。このようなアミノ酸¹³C濃縮度のダイナミクスの違いは次の2つの要因に依存している。

1つ目は、アミノ酸やその前駆体を含む代謝産物の代謝回転速度の違いである。代謝回転速度とは、代謝産物が総量に対して、単位時間あたりに分解または合成される量の割合と定義され、単位は[h]となる(Imahori *et al.*, 2002)。この代謝回転速度は、連続培養のように生産と消費がバランスしている条件下では、式1-2の右辺の代謝フラックス r [mol/gDW/h]を菌体あたりの蓄積量 C [mol/gDW]で割った値に相当し、各代謝産物の蓄積量によって変化する。そのため、生産されたFAAが全てタンパク質に変換されるとし、PAAとFAAの流入フラックスが等しいと仮定すると、PAAに比して蓄積量の少ないFAAの方が代謝回転速度は大きく、標識に要する時間は短い傾向があると考えられる。Fig. 2-11に全条件のPAA¹³C濃縮度のダイナミクスを示した。定常に至るまで20から25時間を必要とした。一方、FAA¹³C濃縮度ダイナミクスは定常に達するには長くとも15時間、条件次第では1時間未満となり、PAAよりも短くなった。この結果を代謝回転速度に基づいて解釈する。菌体内のタンパク質が全て菌体を構成する成分であるとすると、タンパク質の代謝回転速度は大腸菌の比増殖速度と等しくなる。従って、連続培養の定常状態において、比増殖速度は希釈率と等しくなるので、タンパク質の代謝

回転速度は 0.2 [h]となる。そして、タンパク質の標識される時間を式 1-5 にならって書き換えると式 2-14 のように表される。また、式 2-14 から式 2-15 を導くことができる。

$$\frac{d(I_{\text{Protein}})}{dt} = D (I_{\text{FAA}} - I_{\text{Protein}})$$

式 2-14

$$I_{\text{Protein}} = I_{\text{FAA}} (1 - e^{-Dt})$$

式 2-15

ここで、FAA の標識割合が標識開始後、十分に短い時間で定常に達すると仮定することにより、タンパク質へと流入する I_{FAA} の ^{13}C 濃縮度を定数 (=1) と置ける。また、希釈率 D を 0.2 [h]とすると、定常状態では比増殖速度も 0.2 [h]となり、タンパク質は 25 時間で 99.3 % 標識される。以降は時間経過にともない 100 % へと漸近するので、タンパク質が入れ換わるこの 5 世代時間に対応するの時間を事実上の標識率 100 % と見なすことにする。すると、この時間は Fig. 2-11 の実際の ^{13}C 濃縮度が定常に達した時間とほぼ一致することから妥当な結果であったと判断できる。一方、FAA ^{13}C 濃縮度が定常に至るまでの時間は明らかに培養環境に依存する (Fig. 2-12)。詳細は後述するが、FAA の代謝回転速度は比増殖速度ではなく、中間代謝産物などの蓄積量によって制御されていると示唆された。

^{13}C 濃縮度のダイナミクスに影響を与えている 2 つ目の要因は、代謝フラックス分布である。例えば、1- ^{13}C グルコースがペントースリン酸経路のリブローズ 5-リン酸に変換されるとき、1 位に標識された ^{13}C は、二酸化炭素として系外へ排出される。従って、ペントースリン酸経路の下流に位置するアミノ酸であるセリンやアラニンの ^{13}C 濃縮度の成分 M は、この経路への代謝フラックスを反映しているといえる。PAA ^{13}C 濃縮度の最終的な値は、全条件の同一アミノ酸で異なるものとなり、FAA についても同様の結果であった。前項である 2-3-1 において酸素利用量が異なることで、3 条件の代謝状態が異なることに触れたが、この代謝状態(代謝フラックス分布)の違いを反映したため、各条件の同一アミノ酸の ^{13}C 濃縮度は条件に依存した値を取った。これらの値は各条件では異なるが、高分子であるタンパク質は単量体である FAA から合成されたため、同一条件であれば十分に時間がたつと PAA であっても FAA であっても同一のアミノ酸であれば、 ^{13}C 濃縮度は同じ値を示すと予想される。そして、実際に Fig. 2-11、12 で使用されたデータセットについて各条件の相関を調べたところ、PAA と FAA の ^{13}C 濃縮度は高い相関を持った (Fig. 2-13 (A) - (C))。ここで、PAA ^{13}C 濃縮度は ^{13}C グルコースを含んだ培地へ切り換えた 25 時間後の菌体構成タンパク質から得た一方、FAA ^{13}C 濃縮度は供給培地交換 15 時間後のサンプルから得た。培地交換後 15 時間における PAA の炭素原子は完全には ^{13}C 培地に由来する炭素に置換されておらず、培地交換前の天然グル

コースを含む培地に由来する炭素をある程度含んでいる。そして、 ^{13}C 培地交換後 15 時間から取得した FAA と 25 時間後に取得した PAA の ^{13}C 濃縮度が高い相関を示した。この事実は、代謝的な逆反応にあたるタンパク質からの FAA 生産は、無視できる程度あり、FAA は ^{13}C グルコースを単一炭素源にした ^{13}C 濃縮度を持っており、代謝フラックス解析が適切に行えることを示唆する結果となった。もし、タンパク質加水分解に由来するアミノ酸の天然炭素原子が FAA に相当量含まれるとするのであれば、先行研究で議論されたように PAA に起因した影響を考慮する必要がある (Grotkjacer *et al.*, 2004、Iwtani *et al.*, 2007)。しかし、PAA の ^{13}C 濃縮度が定常状態に達していないとき、Fig. 2-12 における FAA のダイナミクスには PAA に起因する偏りはなく、定常状態にあることを示唆した。ここで、400 rpm の 20 時間の値に関して、複数のアミノ酸の ^{13}C 濃縮度が前後の時間点の値と大きく異なったが、これは分析段階で混入した夾雑物による影響と考えられ、代謝状態が変化したものではない。なぜならば、条件毎の同一時間点の各アミノ酸データは、一つのサンプルに由来していること、Fig. 2-9 のエラーバーに示されるように連続培養は安定したものであったこと、 ^{13}C 濃縮度は問題の時間点の前後でほぼ同様の値を示したこと、以上の点から分析に問題があったと考える。そして、 ^{13}C 濃縮度を算出するための GC-MS サンプルの値を確認したところ、問題となったサンプルの値は、その前後の時間点の 10 倍という値を示しており、夾雑物の混入が疑われる結果となった。従って、FAA の ^{13}C 濃縮度は少なくとも 15 時間の段階で定常に達したと言える。

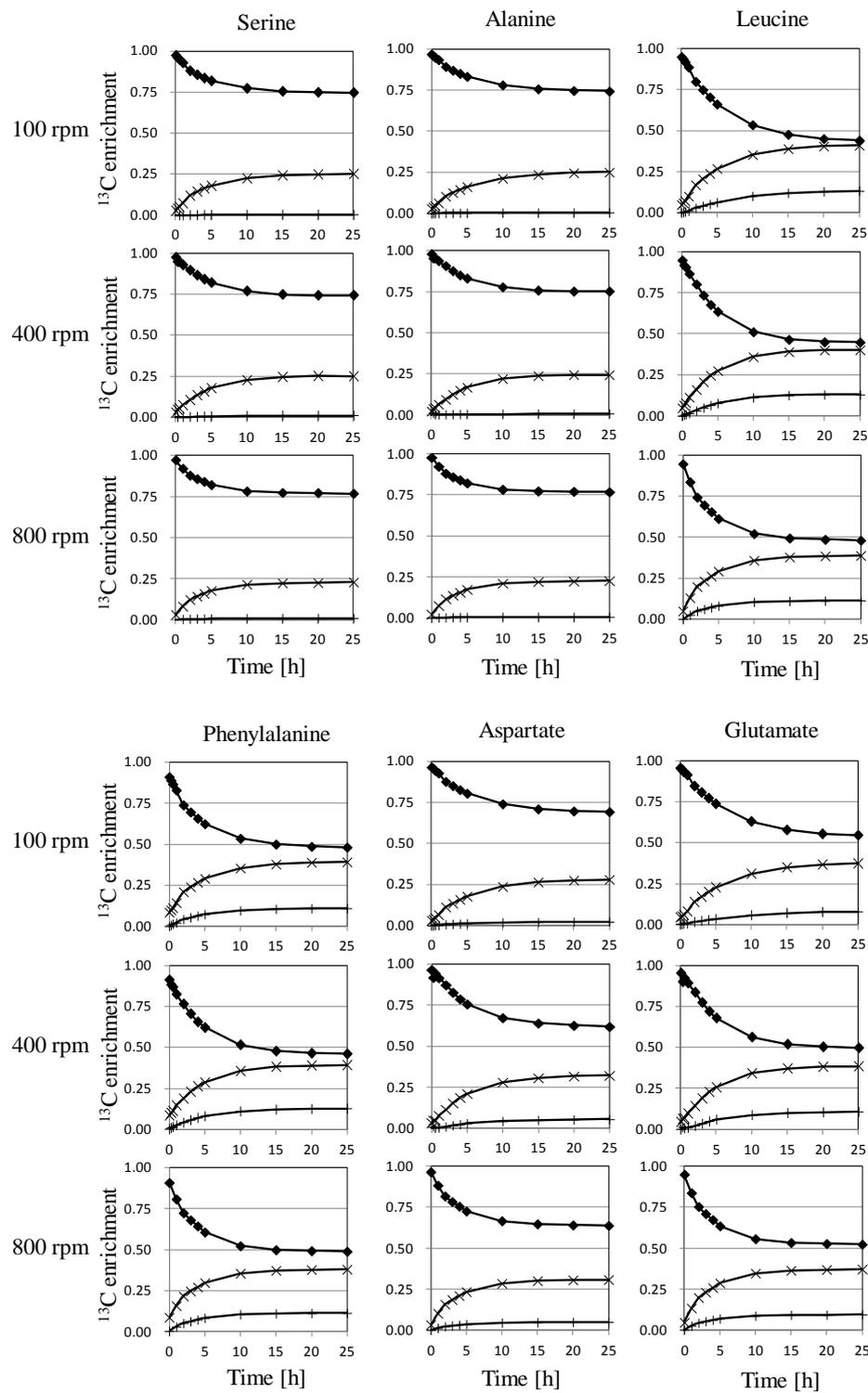


Fig. 2-11 ^{13}C 培地交換後からのタンパク質由来アミノ酸 ^{13}C 濃縮度の変化

diamond shape: ◆、x-mark: ×、cross shape: + は、タンパク質由来アミノ酸中に含まれる ^{13}C 数を意味し、それぞれ 0 個 (M)、1 個 (M+1)、2 個 (M+2) の ^{13}C を含む。

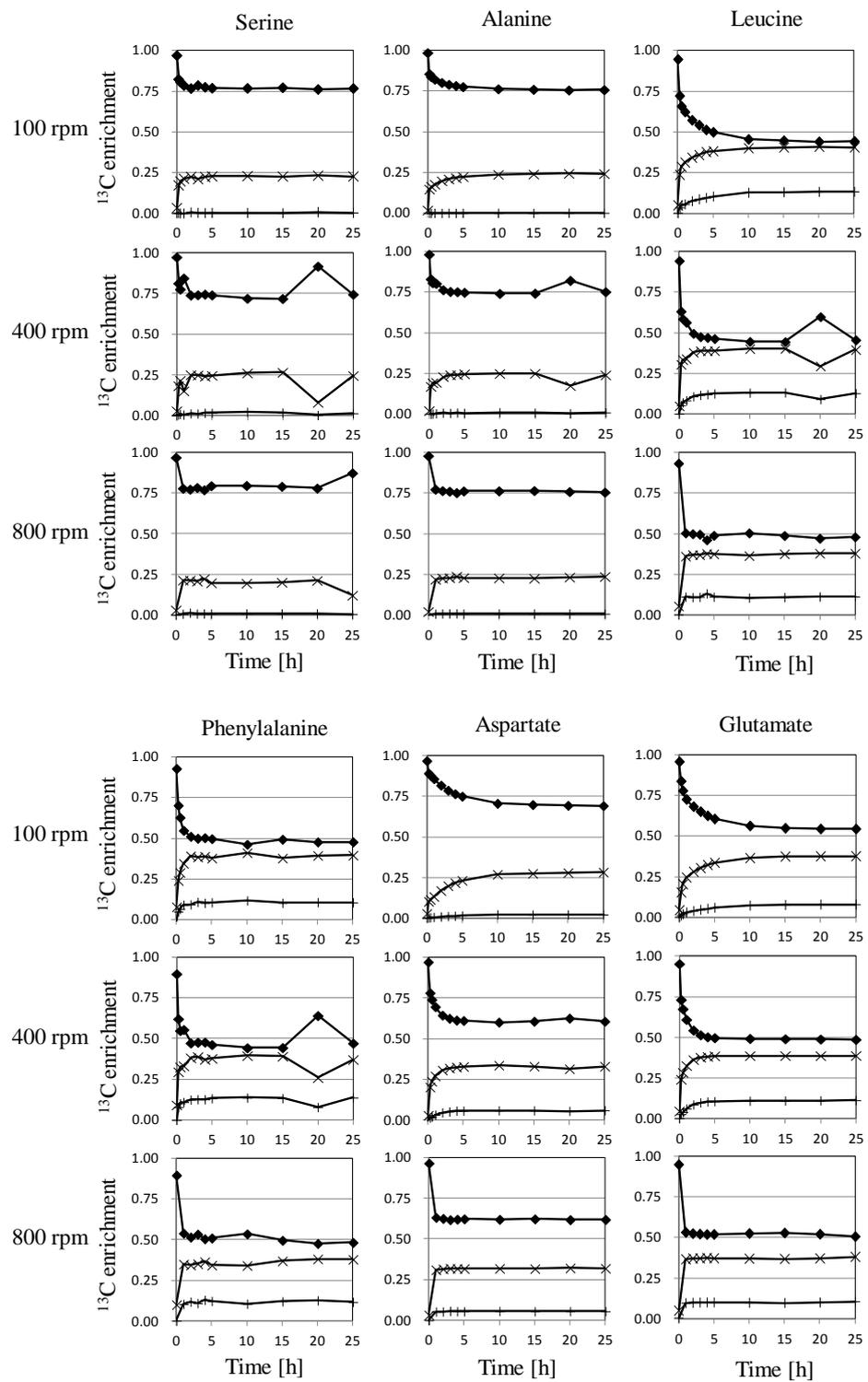


Fig. 2-12 ^{13}C 培地交換後からの遊離アミノ酸 ^{13}C 濃縮度の変化

diamond shape: ◆、x-mark: ×、cross shape: + は、遊離アミノ酸中に含まれる ^{13}C 数を意味し、それぞれ 0 個 (M)、1 個 (M+1)、2 個 (M+2) の ^{13}C を含む。

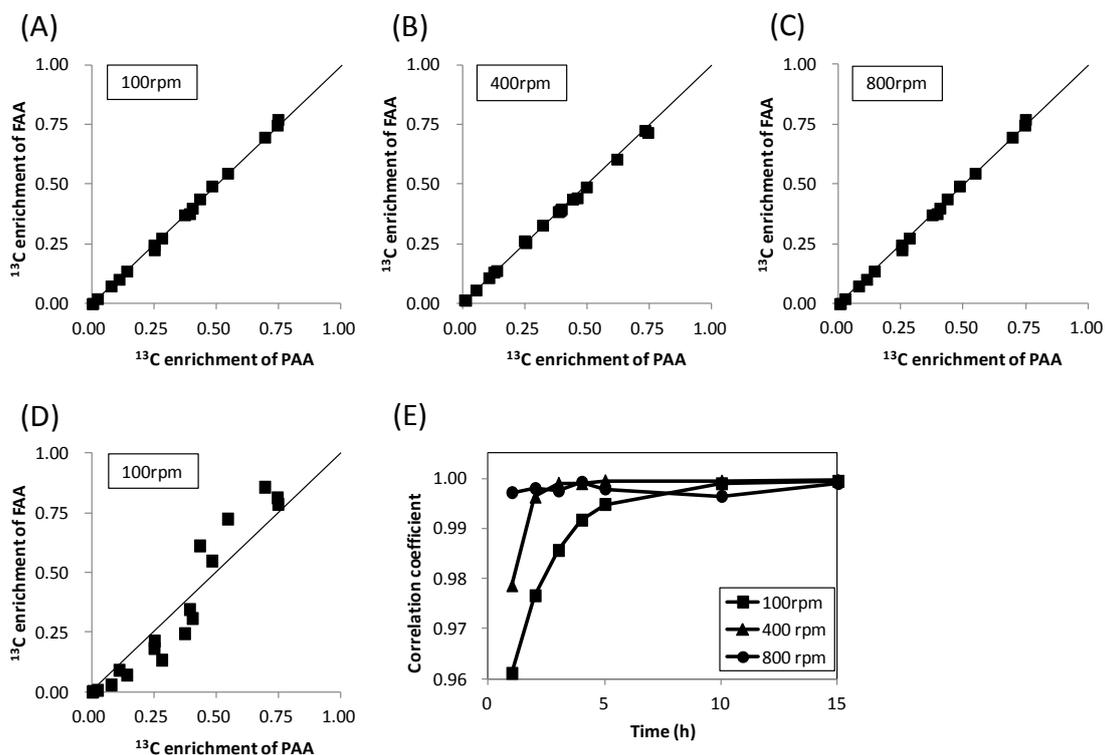


Fig. 2-13 タンパク質由来アミノ酸 ^{13}C 濃縮度と遊離アミノ酸 ^{13}C 濃縮度の相関

この Fig. で扱うタンパク質由来アミノ酸に関わる情報は全て ^{13}C 培地交換 25 時間後のものを使用している。(A) - (C) は各培養条件におけるタンパク質由来アミノ酸と遊離アミノ酸の ^{13}C 濃縮度の散布図であり、遊離アミノ酸の ^{13}C 濃縮度は ^{13}C 培地交換 15 時間後のサンプルから算出している。そして、そのデータセットは Fig. 2-11、12 で使用されたものである。(D) 100 rpm におけるタンパク質由来アミノ酸と遊離アミノ酸の ^{13}C 濃縮度の散布図であり、遊離アミノ酸の ^{13}C 濃縮度は ^{13}C 培地交換 1 時間後のサンプルから算出した。データポイントは対角線に対して著しくずれており、遊離アミノ酸の ^{13}C 濃縮度が定常に至っていないことを示唆する。(E) では、横軸として与えられている ^{13}C 基質添加後の時間における FAA ^{13}C 濃縮度と PAA ^{13}C 濃縮度の相関係数を縦軸に取っている。どれだけの時間が経過すると各条件において従来法と同等の ^{13}C 濃縮度を取るのか、それを相関係数で表している。(A) - (D) の相関係数は、この (E) に反映されている。

次に FAA¹³C 濃縮度のダイナミクスについてより詳細に調べることにした (Fig. 2-12)。前述した通り、¹³C 濃縮度が定常に至るまでの時間は培養条件に依存する結果となった。FAA¹³C 濃縮度は 800 rpm のような好気的な条件では 1 時間未満で定常状態に達した。一方、100 rpm のような嫌気的な条件では同等の結果を示すまでに 5 時間より長い時間を必要とした。また、¹³C 培地へ切り換え 1 時間後の FAA¹³C 濃縮度は、切り換え 25 時間後から得られた PAA の ¹³C 濃縮度から著しく外れる結果であった (Fig. 2-13 (D))。Fig. 2-13 (A) から (D) において示された ¹³C 培地への交換後、25 時間後の PAA の ¹³C 濃縮度と任意の時点における FAA の ¹³C 濃縮度の相関係数は、両者の一致度の指標として利用できる。そこで、FAA¹³C 濃縮度が PAA¹³C 濃縮度と同等の値を持つ定常状態に達するまでの時間を定量するため、FAA および PAA の ¹³C 濃縮度の相関係数の時系列をプロットした (Fig. 2-13 (E))。プロットにあたり、PAA の ¹³C 濃縮度は ¹³C 培地へ交換後 25 時間の値に固定した一方、FAA の ¹³C 濃縮度は横軸に与えられた時間の値を使用しており、各時間における相関係数を求めた。この結果は Fig. 2-12 において、FAA¹³C 濃縮度が定常に至ると同時に、培養 25 時間目の PAA¹³C 濃縮度と同等の結果を得られることを示す。従って、FAA の標識情報を利用した代謝フラックス解析において、その代謝フラックス解析の時間解像度は、培養環境の要素である酸素供給量に著しく依存することを示した。ここで注目しなければならないこととして、定常状態に至るまでの時間差は比増殖速度の差に起因しないということである。全条件において希釈率が 0.2 [h] に設定された連続培養の下、代謝が定常状態にある菌体からサンプルは得られている。このため、¹³C 濃縮度の時系列のデータは、比増殖速度が全培養条件においておよそ同一のときに回収されたと考えられる。そして、もし細胞を構成する各アミノ酸の組成が全培養条件において同じであるならば、細胞における ¹³C グルコースから各アミノ酸への代謝フラックス (流入フラックス) の絶対量も同一となる。従って、比増殖速度が異なることに基づいた各アミノ酸への代謝フラックスの絶対量の違いから、¹³C 濃縮度が定常に至るまでの時間差を説明することは難しい。さらに、FAA¹³C 濃縮度を調べるため、次のような単純化したモデルを用いて個々のアミノ酸の ¹³C 濃縮度を解析した (式 2-16)。I_{FAA} と I_{IM} はそれぞれ、FAA¹³C 濃縮度の成分 (M、M+1、M+2) と上流の代謝産物のそれを表している。r_{in} と r_{out} はアミノ酸への流入フラックスとアミノ酸からの流出フラックスを意味しており、C_{FAA} はアミノ酸の蓄積量を表している。

$$C_{FAA} \frac{d(I_{FAA})}{dt} = r_{in} I_{IM} - r_{out} I_{FAA}$$

式 2-16

単純化するために、代謝状態が定常にあるとき、C_{FAA} は一定であり、r_{in} = r_{out} であると仮定すると式 2-17 が得られる。

$$I_{\text{FAA}} = I_{\text{IM}} \left(1 - e^{-\frac{t}{B}} \right)$$

式 2-17

ここで $C_{\text{FAA}}/r_{\text{in}} = B$ と置いた。B は時定数であり、 $(1 - e^{-1})$ へ到達するために必要な時間に相当する。そして、 ^{13}C 成分 I_{FAA} は時定数 B において I_{IM} へ収束する。この式では上流代謝産物の ^{13}C 濃縮度の動的変化のような標識ダイナミクスの詳細を無視しており、データをフィットさせるためのより詳細なモデルを使用することも可能である。しかしながら、解析におけるデータポイントの相対的な少なさから、データを多くのパラメーターを伴った複雑なモデルへフィットさせることは信頼できない結果を導く。対照的に、この式は単純な方法であり、これを用いて標識ダイナミクスの時間スケールを見積もった。PAA においては全条件、FAA においては 100 rpm、400 rpm における一連のデータをフィットさせることによって、時定数 B を得た。1- ^{13}C グルコースを用いた実験において、一般に測定値が最も大きく、実験誤差が相対的に少ないと予測されることから、フィッティングには標識されていない ^{13}C 濃縮度の要素 M を使用した。FAA の 800 rpm においては、 ^{13}C 濃縮度が定常に至るまでの時間がサンプリング間隔に対して短すぎたため、時定数は決定できなかった。しかしながら、このフィッティング結果は、FAA の 800 rpm において時定数が 0.1 よりも小さいことを示した。Fig. 2-14 に今回用いた代謝モデルを利用して、時定数を求めた各アミノ酸の代謝経路での位置を表した。まず、FAA の時定数に着目する。400 rpm では、代謝経路上の基質であるグルコースから離れた位置にあるアミノ酸の時定数ほど大きな値をとっている。例えば、セリンやアラニンのような解糖系から前駆体が合成されるアミノ酸は TCA サイクルから前駆体が生産されるアスパラギン酸やグルタミン酸よりも時定数は小さい。基質であるグルコースからあるアミノ酸への代謝反応数が多いとき、代謝反応数が少ないアミノ酸生合成系よりも生合成に必要な時間は徐々に長くなるため、この結果は自然なものといえる。一方、興味深い点は 100 rpm において、TCA サイクルに関わる前駆体から生合成されるアミノ酸の時定数が他のものより著しく大きかったことである。これらのアミノ酸の大きな時定数が 100 rpm における ^{13}C 濃縮度の全要素の収束を遅らせた (Fig. 2-13 (E))。上述したように、比増殖速度は全培養でほぼ同一であるため、菌体構成成分が大きく変化しないと仮定すると、 ^{13}C グルコースからこれらのアミノ酸への代謝フラックスの絶対量は 3 条件間で類似していると期待できる。従って、各アミノ酸を生成する代謝フラックスの差異によってこの時定数の差異を説明することは難しい。このようなアスパラギン酸とグルタミン酸の大きな時定数の一つの可能性として、100 rpm におけるこれら FAA の蓄積量が他の培養条件のそれよりも大きかったことが挙げられる。他の可能な説明としては、AcCoA のような中間代謝産物の蓄積量が大きかったこと、あるいは、下流に位置する全ての代謝産物が大きな蓄積量を持っていたことが挙げられ、それらが両者の

時定数を大きくしたと考察する。酢酸とエタノールは AcCoA を前駆体としており、100 rpm の培養条件下である程度生産されているという事実は細胞内の AcCoA などの蓄積を支持する (Fig. 2-9)。しかし、これら可能性を証明するためには、代謝産物の詳細な定量が必須である。次に PAA の時定数についてである。PAA の ^{13}C 濃縮度の時間変化は上記の式 2-15 の通りである。そして、FAA の式 2-17 と比較することで、時定数は希釈率の逆数であることが分かる。今回の実験では希釈率を 0.2 [h] に設定したことから時定数は理論的には 5 となる。結果を確認すると 3.5 から 6.5 の値となった。このような幅を持った原因として、値の増加に関してはアミノ酸からタンパク質へ至る経路に分岐があったことなどが考えられる。上述の式ではこれが無いと仮定している。また、減少に関しては、実際の希釈率が設定値よりもわずかに高かった可能性がある。そして、増減両方の理由として GC-MS での測定誤差が考えられる。ここで、FAA における Glu と Asp の相対的な時定数の大きさの理由について改めて考えると、この PAA のような原因も考えられる。しかし、これらの値は他の FAA の時定数よりもオーダー単位でその値が異なるため、蓄積量の相対的な多さが主な要因であると示唆される。

次に PAA と FAA について、その時定数の比 (PAA/FAA) と濃度の比 (PAA/FAA) について議論する。今回、PAA と FAA の濃度の定量は行なっておらず、その値は Table 1-1 の文献値を利用した。その結果、取り得る濃度比の範囲に対して、今回の各アミノ酸の時定数の比はおおよそ収まるものであった。また、外れたとしても、その数値のオーダーは一致するものであった。上述した通り、時定数は仮定に基づいた算出値なので、少し外れた値とはなったが、おおよそ妥当な結果となった。これは実際の蓄積量がおおよそ文献値の濃度範囲にあることを示唆する。

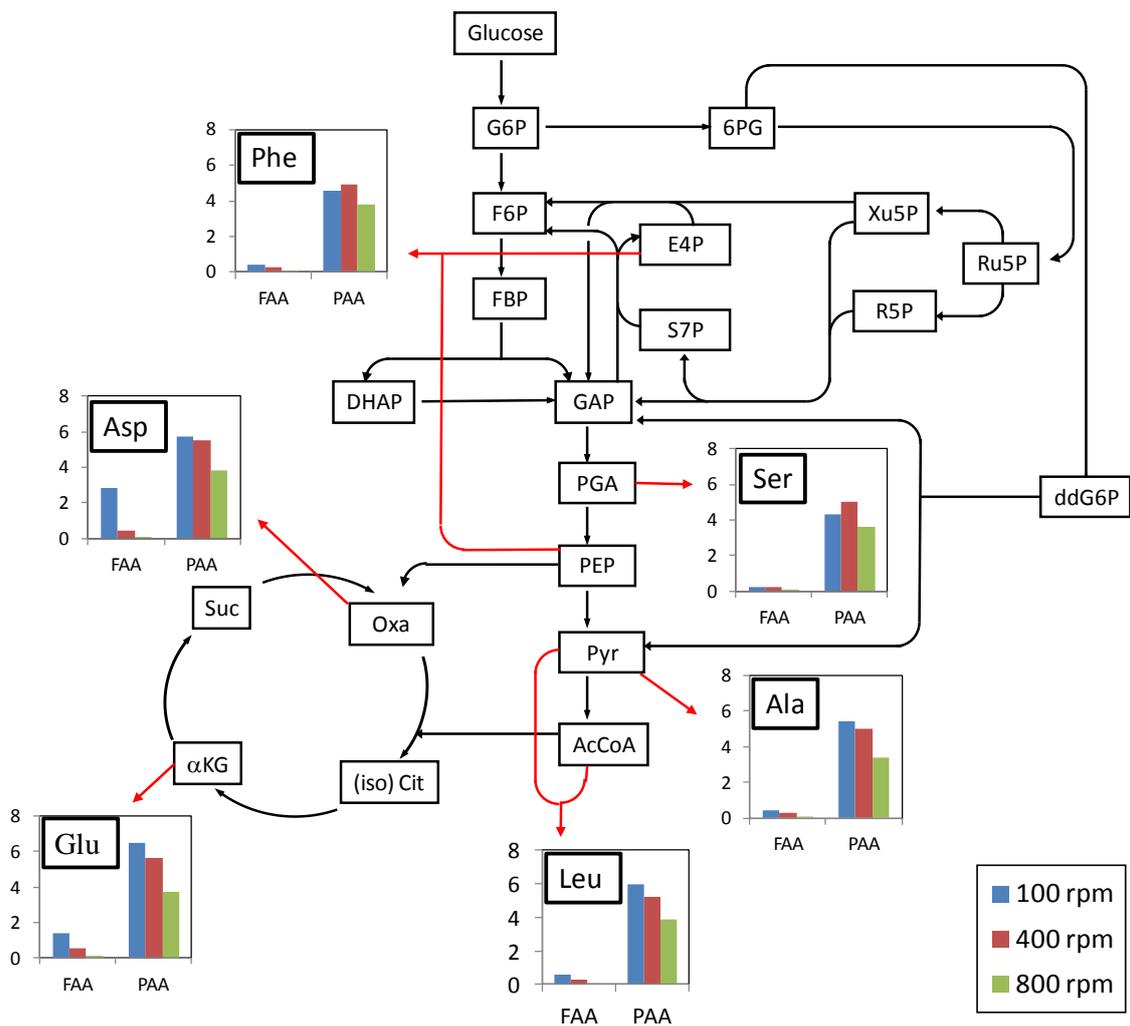


Fig. 2-14 中央代謝経路から合成されるアミノ酸の時定数

¹³C濃縮度が定常に達するまでの遊離アミノ酸およびタンパク質由来アミノ酸の時定数を求めた。そして、ある時定数を持つ各アミノ酸の代謝経路上での位置を今回の代謝モデルで表した。赤色は、生合成されるアミノ酸と前駆体の関係を表している。時定数の単位は[h]である。

2-3-3 異なる酸素供給量条件における大腸菌の代謝フラックス分布

得られた FAA¹³C 濃縮度のデータが、代謝フラックス解析のために十分なものであるか評価するため、FAA だけでなく PAA を用いた代謝フラックスを求めた。後者のデータの条件として、PAA の構成炭素は ¹³C 培地に由来する炭素にほぼ完全に置換されている必要があり、本実験の条件では ¹³C 培地へ交換後 25 時間のものを使用した。このような条件は PAA を用いる代謝フラックス解析において広く適用されている (De *et al.*, 1999)。そして、Fig. 2-15 と 2-16 に FAA または PAA から求められた、酸素供給量を変えた 3 条件の代謝フラックス分布を示した。好気条件である 800 rpm と比較して、微好気条件 (100 rpm) の下ではペントースリン酸経路への代謝フラックスが減少するといった代謝変化の違いは、これまでに報告された内容と一致した (Chen *et al.*, 2011)。FAA、または PAA から見積もられた代謝フラックス分布の差を定量するために、以下の式 2-18 から求められるユークリッド距離を利用した。代謝フラックス分布を構成する代謝フラックスの数だけ次元を持つユークリッド空間を構築すると、2 つの異なった代謝フラックス分布を 2 つの点として置くことができる。そして、両者間の距離を代謝フラックス分布全体の違いの指標として利用できる。そのため、¹³C 培地へ交換 25 時間後の PAA の ¹³C 濃縮度から求められた代謝フラックス分布と、それ以前の時間点における FAA の ¹³C 濃縮度から得た代謝フラックス分布のユークリッド距離を求めた。そして、FAA から求められた代謝フラックス分布は、¹³C 培地へ交換後何時間で従来法である PAA から求められた代謝フラックス分布と類似するか確認した。

$$\sqrt{\sum_i (f_i^{\text{pro}} - f_i^{\text{free}})^2}$$

式 2-18

ここで、 f_i^{pro} と f_i^{free} はそれぞれ PAA と FAA から見積もられる代謝モデル上の i 番目の代謝フラックスを意味しており、その合計はモデルの各代謝フラックスから得た。Fig. 2-17 では、¹³C 培地へ交換した後の両手法の代謝フラックスの差がどの程度培養条件へ依存しているのかを示している。上述した通り、PAA から見積もられる代謝フラックスに関しては ¹³C 培地に交換後 25 時間に得られる値で評価した。FAA¹³C 濃縮度のダイナミクスから予想されるように、両者の距離がおおよそゼロへと漸近する時間は培養条件に依存する結果となった。ここで述べる距離ゼロとは、FAA または PAA から見積もられた代謝フラックス分布が同一となる時間である。800 rpm の好気的な条件では、¹³C 培地を供給し始めてから 1 時間後に得た FAA は、PAA から得られたものと同様の代謝フラックス分布を推定するのに十分な情報を提供した。対照的に 100 rpm の微好気条件では、¹³C 培地の供給を開始してから代謝フラックスを求めるのに約 15 時間を必要と

した。さらに、FAA データに基づいた代謝フラックスの精度が代謝経路に依存しないかどうかを調査した。そのために、100 rpm において、培地交換後 10 時間以下から得られた FAA の ^{13}C 濃縮度に基づいた代謝フラックスと、定常状態にある PAA の ^{13}C 濃縮度から求められた代謝フラックスを比較した。その結果、部分的な代謝フラックスに大きな差異があるのではなく、代謝フラックス分布全体として大きく外れたものであった。その理由として、FAA ^{13}C 濃縮度はこれらのサンプリングポイントにおいて定常に至っていないことが挙げられる。従って、FAA、または PAA から求められた 2 つの代謝フラックス分布に生じる差は特定の代謝フラックスに起因するものではないことが判明した。

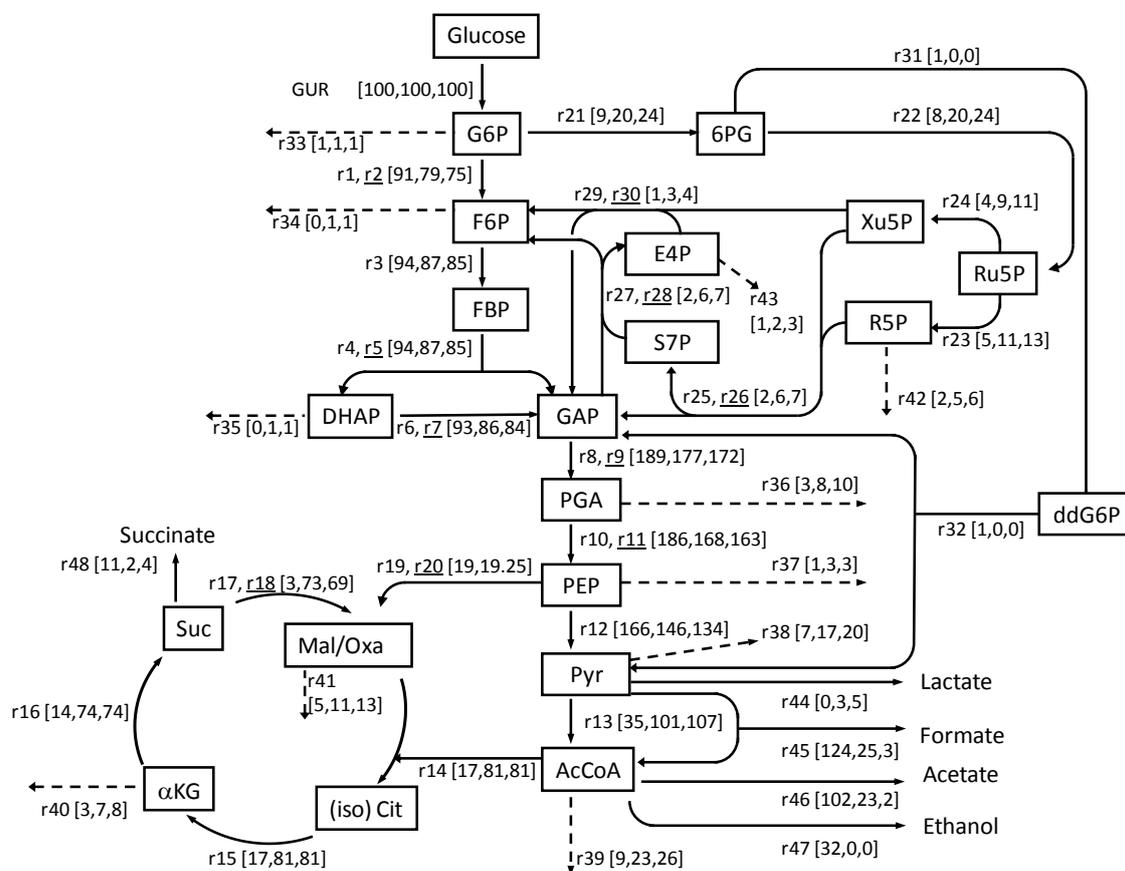


Fig. 2-15 異なる攪拌回転数の連続培養における大腸菌の代謝フラックス分布 (PAA)

^{13}C 培地へ交換 25 時間後の PAA から求めた代謝フラックス分布である。括弧内の数値はグルコース取り込み量を 100 とした時の相対的な代謝フラックスであり、左から攪拌回転数 100、400、800 rpm の連続培養の値を意味する。破線は生合成フラックスを表す。可逆反応を含む代謝経路は上流からの下流へ、下流から上流へ戻る代謝フラックスを決定できなかったため、それらの代謝フラックスの和を記載している。

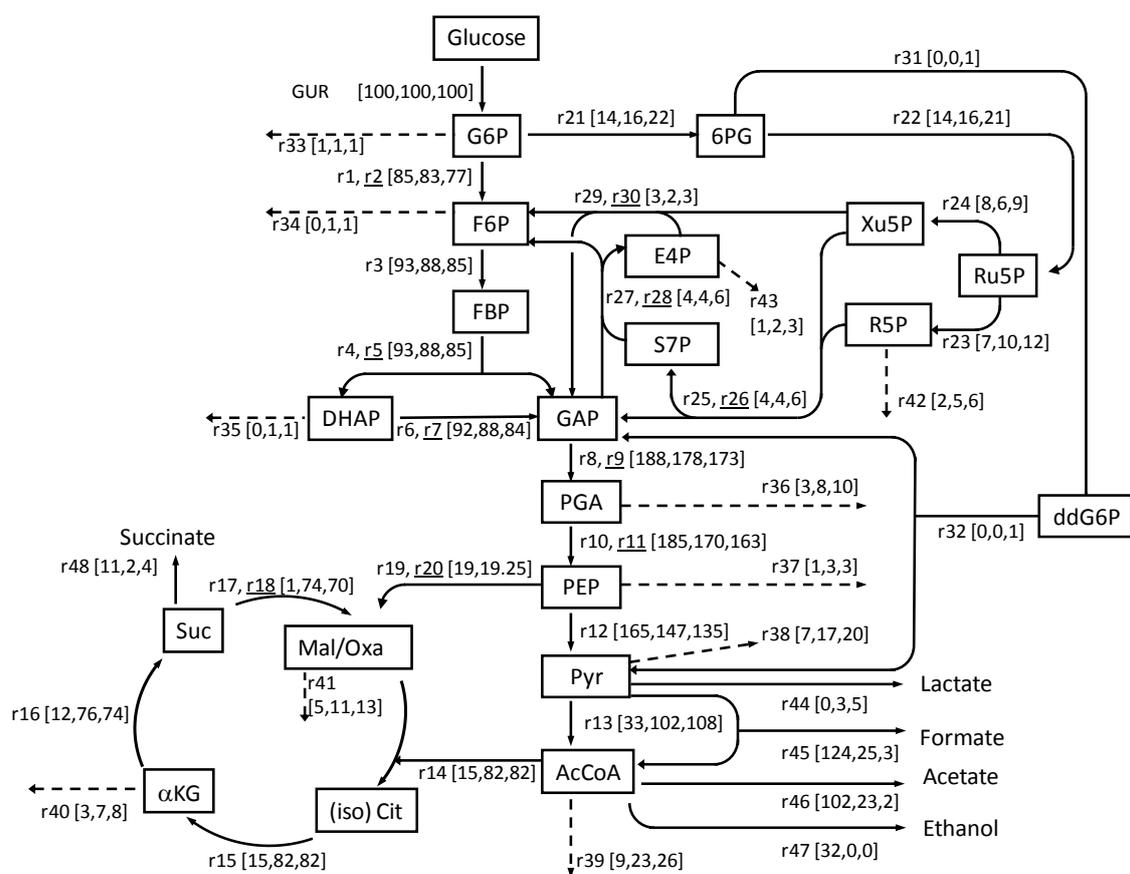


Fig. 2-16 異なる攪拌回転数の連続培養における大腸菌の代謝フラックス分布 (FAA)

¹³C 培地へ交換 15 時間後 (100 rpm)、5 時間後 (400 rpm)、そして 1 時間後 (800 rpm) の遊離アミノ酸から求めた代謝フラックス分布である。括弧内の数値はグルコース取り込み量を 100 とした時の相対的な代謝フラックスであり、左から攪拌回転数 100、400、800 rpm の連続培養の値を意味する。破線は生合成フラックスを表す。可逆反応を含む代謝経路は上流からの下流へ、下流から上流へ戻る代謝フラックスを決定できなかったため、それらの代謝フラックスの和を記載している。

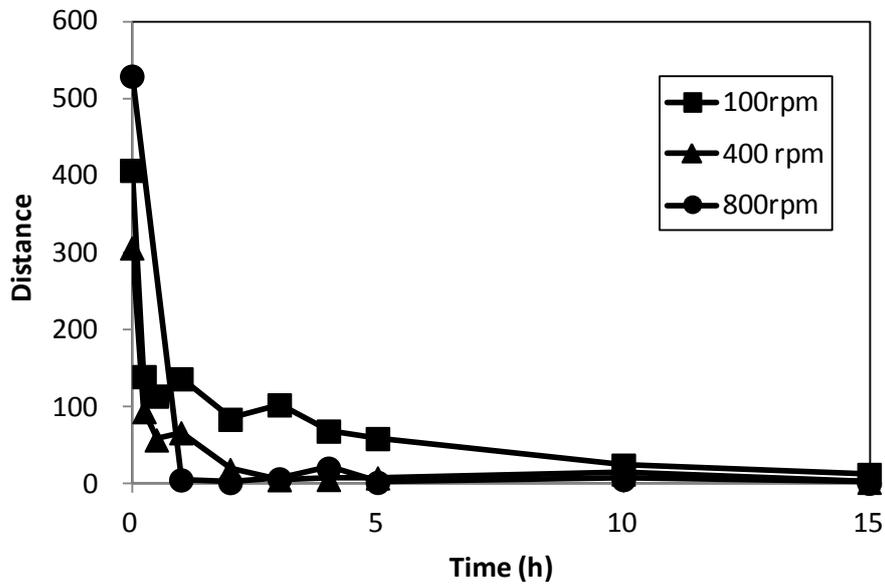


Fig. 2-17 タンパク質由来アミノ酸と遊離アミノ酸から得た代謝フラックス分布間のユークリッド距離の経時変化

タンパク質由来アミノ酸から得られた代謝フラックス分布は Fig. 2-15 の 25 時間のものに固定し、遊離アミノ酸から得られた代謝フラックス分布は横軸として与えられた時間のものを使用し、両者の代謝フラックス分布間の差をユークリッド距離として求めた。それぞれの代謝フラックス分布は、ユークリッド空間において 2 箇所位置する。このユークリッド空間の次元数は代謝フラックス分布を構成する各代謝フラックスの数に一致する。

2-4 結言

現在、主要な代謝経路の物質流量を定量できる代謝フラックス解析が微生物の代謝状態を示す指標として利用されている。そして、生物の主要な代謝経路として知られる中央代謝経路などがどのように物質生産に寄与しているのかが明らかになりつつある。標識された基質を細胞に取り込ませ、その代謝状態に依存した標識情報を持つ代謝産物を解析することで代謝フラックスを決定する。これまでに物理化学的な安定性、測定の容易さからタンパク質由来アミノ酸 (PAA) の ^{13}C 標識情報が利用され、代謝フラックス解析法が確立されてきた。一方、代謝フラックス解析は細胞の代謝は定常状態にあると仮定している。このため、細胞の代謝情報が PAA の標識情報に反映されるまでの数十時間、代謝を定常に保ち続ける必要があった。代謝的定常状態において、代謝回転速度は代謝フラックスが同じであれば代謝産物の蓄積量が少ないほど速い。そこで近年、相対的に蓄積量が少なく、標識時間が短い遊離アミノ酸 (FAA) が代謝フラックス解析に利用されるようになってきた。FAA はタンパク質の前駆体であるため PAA と同一物質である。この点で従来法から実験手法を比較的簡単に移行できる利点もある。しかし、PAA と比較して、その標識情報に代謝状態が反映されるまでの時間がどの程度短いのか、どのような性質を持ち得るのかは明らかにされて来なかった。そこで、本章では PAA と FAA の ^{13}C 標識情報に代謝状態が反映される時間がどの程度異なるのか、また、FAA の標識情報を利用することで得られる代謝フラックス分布は従来法と同等となるのか、これらを明らかにすることを目的とした。

PAA と FAA の性質の違いを複数の条件について検討するために培養槽の攪拌回転数を変え、酸素供給量を異ならせた独立した 3 つの連続培養系を構築した。そして、 ^{13}C グルコースを添加してからの両者の ^{13}C 標識情報を ^{13}C 濃縮度という形で捉え、そのダイナミクスを追った。そして、それらのデータから代謝フラックス解析を行うことで従来手法との結果の違いを検討した。

大腸菌の連続培養では攪拌回転数を 800 rpm、400 rpm、100 rpm と異なる値に設定した。このように連続培養を構成する一要素である酸素供給量のみを変化させることで意図的に代謝状態を変化させることができ、その代謝状態は NADH を酸化できる酸素量に起因していると説明付けられるものであった。次に、これらの 3 つの連続培養系から回収された大腸菌の PAA と FAA の ^{13}C 濃縮度のダイナミクスを追った。その結果、PAA ^{13}C 濃縮度が定常に至るまでの時間は培養条件、アミノ酸の種類にかかわらず、25 時間程度であることが判明した。これはタンパク質の代謝回転速度である比増殖速度から予測される時間と一致する結果であった。一方、FAA において ^{13}C 濃縮度が定常に達する時間は 100 rpm、400 rpm、800 rpm と酸素取り込み速度が大きくなるに従って、15 時間、5 時間、1 時間未満と短くなった。また、これらの時点で既に 3 条件共に PAA ^{13}C 濃縮度が定常に至る培養後 25 時間と同等の ^{13}C 濃縮度を持ち、その代謝フラックス解析結

果は PAA の標識情報を用いたものと同様であった。そして、これらの ^{13}C 濃縮度のダイナミクスから定常状態へ至る時定数を求めたところ、100 rpm のアスパラギン酸とグルタミン酸の値が著しく大きいことが判明した。このような違いを引き起こした原因の一つとして、中間代謝産物 (IM)、もしくは FAA の細胞内蓄積量に差があり、FAA の代謝回転速度に差が生じたのではないかと示唆された。また、時定数から PAA/FAA 比を求め、一方で細胞内蓄積量の範囲 (文献値) から PAA/FAA を求めた。その結果、今回各条件から求められた FAA の時定数は細胞内蓄積量から見て妥当であると分かった。

つまり、FAA を用いた代謝フラックス解析では、従来手法である PAA の ^{13}C 濃縮度が定常に至るまでに必要にされてきた時間を長くとも 3/5 以下にまで短縮でき、その時点で従来法と同様の代謝フラックスを得られた。また、定常に至る時間は、培養環境の一要素である酸素供給量によって 3/5 から 1/25 未満まで変化した。このように従来手法と FAA による手法の ^{13}C 濃縮度の定常に至るまでの時間を定量的に比較し、それが酸素供給量のような培養条件によって左右されることはこれまでに報告がなく、今回の実験によって初めて明らかにされた。そして、このような性質は酸素利用量の違いによって生じた細胞内の代謝産物の蓄積量に依存していることが示唆された。このような代謝産物の蓄積量の変化は、酸素供給量だけでなく、栄養源の濃度や種類、温度、そして、pH といった他の主要な培養条件の変化によっても引き起こされる可能性がある。従って、FAA を用いた代謝フラックス解析をある培養条件に適用する際、一度は ^{13}C 濃縮度のダイナミクスを追う必要があるといえる。これにより培養条件によって変化する FAA の定常に至る時間を明確にできるものと考えられる。また、PAA との相対的な評価ではなく、絶対的な時間を見た場合、FAA の標識時間は 15 時間から 1 時間未満となった。その最短時間の単位は、時間から分となり、IM に匹敵することを実証した。

3章 遺伝子発現量の変化に伴う代謝状態の解析

3-1 緒言

生物はグルコースのような基質を有機酸や二酸化炭素などに代謝する過程で ATP などの形でエネルギーを取得し、菌体構成成分を合成する。このことは物質生産に用いられる大腸菌のようなモデル生物にも当てはまり、基質から目的とする有用物質以外に菌体や副産物である有機物が生産される。従って、有機酸などの目的物質以外の炭素化合物の生産を抑制することが高い収率に繋がる。そこで、細胞の代謝状態を意図的に変化させるため、培養環境の変化や遺伝子組換え技術が利用されている。大腸菌と同じくモデル生物であるコリネ菌の場合、界面活性剤や抗生物質の添加が代謝状態の切り換えを引き起こす環境変化として利用され、菌体増殖期からグルタミン酸生産期へ代謝状態を誘導することが知られている (Kim *et al.*, 2011)。しかし、たとえ生産性を向上できたとしても、どの程度向上できたのか定量的に評価できる指標が求められる。そのための指標として、基質から目的物質などへの物質の流れを定量的に解析できる代謝フラックス解析が知られている。上述したコリネ菌の例では、増殖期とグルタミン酸生産期の両条件に対して解析が行われたことによって、グルタミン生産に重要な代謝経路が特定されている。また、遺伝子組換え技術を利用した例として、中央代謝経路の様々な経路を破壊することにより、代謝フラックス分布がどのように変化するのかが研究されており、物質生産に役立てることができる (Peng *et al.*, 2004、Li *et al.*, 2006)。

このように物質生産に向けた代謝フラックス解析が行われているが、その適用対象は代謝が定常状態にあるときに限定されている。これは代謝フラックス解析が定常状態を仮定していることに由来し、それぞれの代謝産物の生産速度と消費速度が等量であり、代謝産物の蓄積量と標識情報に変化がないことを前提としているからである。そのため、広く用いられている長い標識時間を持つ PAA を用いた代謝フラックス解析の場合、標識開始後からサンプリングまでの比較的長い時間にわたって (例えば比増殖速度が 0.2 [h] の場合で 25 時間程度)、代謝状態を一定に保つ必要がある。このような条件を満たすためには、連続培養の定常状態や、回分培養における対数増殖期といった、代謝状態を長時間にわたって一定に保つことが可能な培養系が必要であり、代謝フラックス解析を適用できる培養系の制限となっている。しかしながら、実際の物質生産では、雑菌の混入や目的物質の精製コストなどの問題から連続培養よりも流加培養など、より短い時間スケールで代謝状態が変化する培養系がしばしば用いられ、そうした系においても適用可能な代謝フラックス解析が求められている。近年、標識時間が他の代謝産物に比べて短いという特徴を持つ、中間代謝産物 (IM) の標識情報を解析することが可能とな

り、それを用いた代謝フラックス解析の可能性が議論されている。しかし、代謝状態が変化する培養系において、その変化を代謝フラックスの変化として追従できるのかは未だに曖昧とされている。そこで本章では、中間代謝産物を利用した代謝フラックス解析を確立し、代謝の変化を追従できるのか明らかにすることを目的とした。

実験には isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) の添加により *pgi* 遺伝子の発現量を制御できる大腸菌 YUEC04 株の連続培養系を用い、連続培養系において IPTG 濃度を変化させることによって、代謝状態の変化を観測できる培養系を構築した。*pgi* 遺伝子は phosphoglucose isomerase をコードしており、これは解糖系の最上流に位置する glucose-6-phosphate (G6P) を基質として fructose-6-phosphate (F6P) に変換する機能を持つ。G6Pからの主要な代謝経路として、他に *zwf* 遺伝子がコードする G6P dehydrogenase によって触媒されるペントースリン酸経路がある (Fig. 3-1)。従って、*pgi* 遺伝子の発現量変化はペントースリン酸経路を含む著しい代謝変化を期待できる。そして、この代謝変化を追従するため、IM の ^{13}C 標識情報を利用した代謝フラックス解析を試みた。

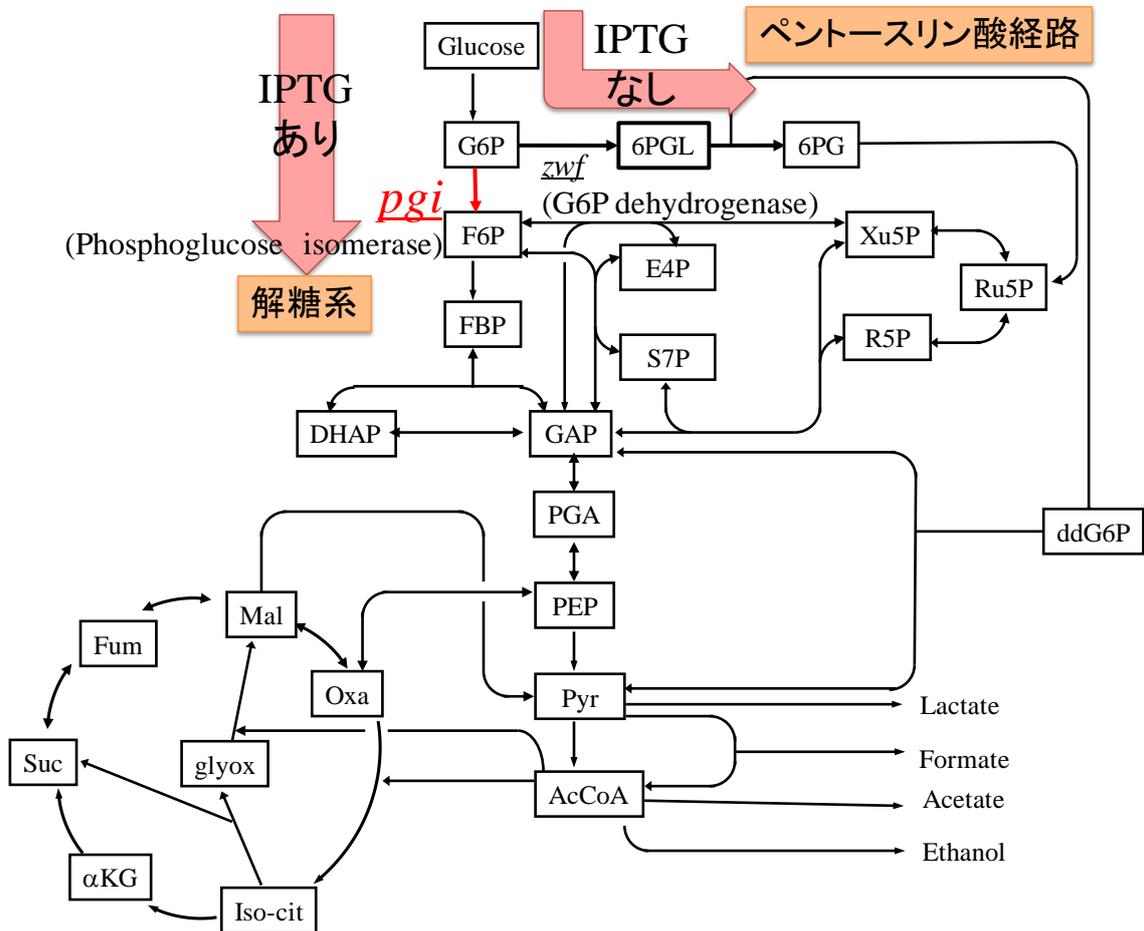


Fig. 3-1 *pgi* 遺伝子の発現量変化が引き起こす代謝フラックスの変化

後述する YUEC04 株では、IPTG の濃度に依存して中央代謝経路上流の代謝フラックスが著しく変化するだけでなく、下流にもその影響が及ぶことで代謝フラックス分布全体に大きな変化を引き起こせると期待できる。

3-2 実験材料と実験方法

3-2-1 使用菌株

本章では大腸菌 BW25113 を親株とした YUEC04 株、YUEC00 株、そして JWK3985 株を用いた (Table 3-1)。YUEC04 株はゲノム上の *pgi* 遺伝子が破壊されているとともに、IPTG の添加により *pgi* 遺伝子の発現を制御することができるプラスミド pFE604-*pgi* を持った株である。従って、IPTG が存在すると野生株に近い振る舞いとなり、逆に存在しない状況下では *pgi* 破壊株と類似した挙動を取ると予想される (Fig. 3-2)。そして、YUEC00 株は BW25113 に pFE604 を導入した株である。さらに、JWK3985 株は、野生株である BW25113 の *pgi* 遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子により破壊された *pgi* 破壊株である。

Table 3-1 使用された菌株と遺伝子型

Strain	Genotype
BW25113 (parent strain)	<i>lacI</i> ^A <i>rrnB3</i> Δ <i>lacZ4787</i> <i>hsdR514</i> Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ (<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph-1</i>
YUEC00 (control strain)	BW25113 pFE604
YUEC04	BW25113 Δ <i>pgi::kan</i> -pFE604- <i>pgi</i>
JW3985	BW25113 Δ <i>pgi::kan</i>

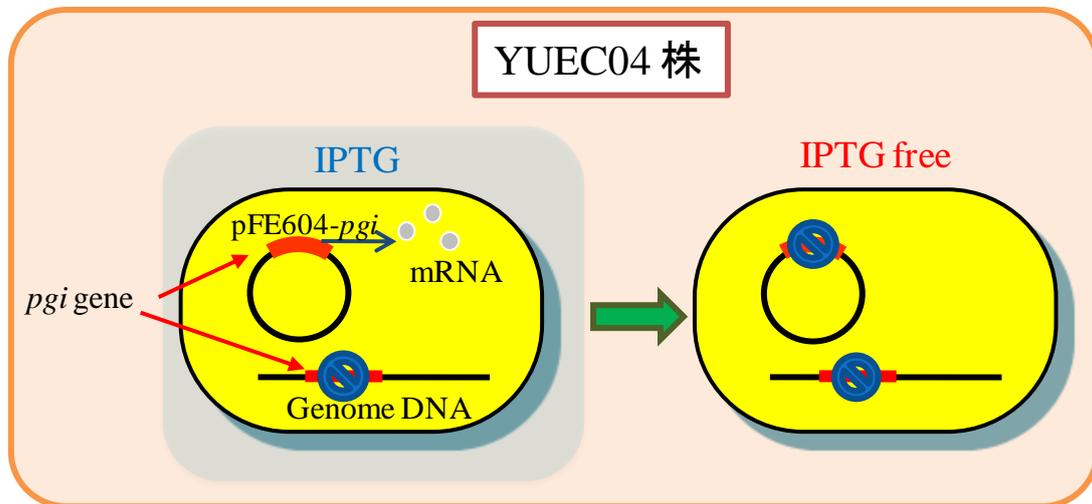


Fig. 3-2 IPTG の有無による YUEC04 株の挙動の模式図

pFE604-*pgi* の *pgi* 遺伝子は *lac* オペロンの下流に位置している。そのため、ラクトースのアナログ物質である IPTG が存在すると、IPTG は *lac* オペロンのリプレッサーと結合し、*pgi* の転写が行われる。一方、ゲノム上の *pgi* 遺伝子はカナマイシンによって置き換えられており、*pgi* 遺伝子の転写は起こらない。

3-2-2 使用培地

大腸菌 YUEC04 株の培養には、最少培地である M9 培地 (17.1 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、3 g/L KH_2PO_4 、0.5 g/L NaCl 、2 g/L NH_4Cl 、123 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.78 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、14.7 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、10 mg/L Thiamin-hydrochloride、5 g/L Glucose) を用いた。また、培養の際には消泡剤として 0.001 % アデカノールを添加した。必要に応じて、20 mg/L カナマイシン、20 mg/L クロラムフェニコール、100 mg/L IPTG を添加した。

3-2-3 培養操作

3-2-3-1 前培養

500 mL 坂口フラスコに IPTG を含む 40 mL の M9 液体培地を入れ、YUEC04 株を植菌し、37 °C で 14 時間振とう培養した。

3-2-3-2 連続培養実験

第 2 章と同じ条件により連続培養を行った。連続培養の装置は、温度、pH、溶存酸素濃度制御システムを持つ 1 L ジャーファーマンター BMP type bioreactor (ABLE) を用いて行った。培養体積は M9 培地を 400 mL、培養温度は 37 °C、pH は 5N アンモニア水によって 7.0 に維持した。また、通気量は 400 mL/min と設定し、希釈率は 0.2 h⁻¹ で行った。

前培養液を OD₆₀₀ = 0.1 となるように、IPTG を含む M9 液体培地を入れたジャーファーマンターに植菌し、回分培養を開始した。そして、菌体が十分に増殖し、グルコースが残った状態にある培養 5 時間後に連続培養に切り換えた。

3-2-3-3 ¹³C 標識実験

連続培養が定常状態に達した培養開始 40 時間後 (8 滞留時間後)、流入培地を IPTG と ¹³C グルコースを含む培地へと切り換えた。このとき用いた ¹³C 標識グルコースは、1-¹³C グルコースと U-¹³C グルコースを 1 : 1 となるようにした。さらに、培養開始 65 時間後に (¹³C 基質投入より、5 滞留時間後)、¹³C グルコース M9 液体培地を IPTG の含まない培地にすることで、*pgi* 発現量の変化を誘導し、120 時間まで連続培養を続けた。

3-2-4 サンプルングとサンプル前処理

菌体濃度測定用サンプル、乾燥菌体重量用サンプル、培養液上清測定用サンプルは第 2 章と同様の手法でサンプルングとその準備を行った。その他のサンプルとして、中間代謝産物の ¹³C 濃縮度測定および定量のための CE-MS 用サンプル、*pgi* 発現量の解析用サンプルを適宜回収した。これらのサンプルの前処理については後述する。

サンプルングは、¹³C 培地への交換直後である 40 – 45 時間では 1 時間間隔、代謝状態が一定と考えられる 45 – 65 時間では 5 時間間隔、IPTG を含まない ¹³C 培地に切り換えることで *pgi* 発現量の変化が始まるであろう 65 時間から 80 時間では 3 時間間隔で行った。また、代謝が変化しているであろう 80 時間以降に関しては、中間代謝産物の ¹³C 濃縮度測定のための CE-MS 分析用サンプルは 30 分間隔で回収し、他の解析用のサンプルは 1 時間間隔で回収した。

3-2-4-1 中間代謝産物

中間代謝産物を回収するにあたり、そのときの菌体量は菌体濃度 (OD_{600}) と培養液 (mL) の積が 30 となるよう調整した。回収方法は、菌体培地をポアサイズ $0.5 \mu\text{m}$ のフィルターを用いて瞬時に吸引ろ過し、10 mL の Milli-Q 水で 2 度洗浄した。そして、フィルター上の菌体をすぐさま 2 mL のメタノールに浸すことで代謝反応を停止させるとともに、代謝物質の抽出を行った。メタノールに関して、事前に濃度補正用内部標準物質として、終濃度 $5 \mu\text{M}$ となるように内部標準液 H3304-1002 (Human Metabolome Technologies) を添加した。ろ過や洗浄といった操作時間の差は代謝状態の変化に影響を及ぼす可能性があり、各サンプルにおいて統一した。さらに、1 分間の超音波処理を行い、代謝物質をメタノールに完全に抽出した。このメタノール溶液を 1.6 mL 取り、そこへ 1.6 mL のクロロホルムと 500 μL の Milli-Q 水を加え、激しく混合した。次に、その混合液を遠心 ($4,600 \times g$, 4°C , 5 min.) し、中間代謝産物を含む水層、分析に悪影響を及ぼす脂質を含む疎水層、そして菌体構成タンパク質などを含む菌体の残渣を分離した。中間代謝産物が含まれる水層を限外ろ過フィルターに乗せ、遠心することで残存タンパク質を除いた ($9,100 \times g$, 4°C , 約 3 h)。ろ過された溶液を減圧遠心機にセットし、約 2 時間かけて乾燥させた。CE-MS による分析の直前まで、それを -80°C で保存した。そして、分析にあたり、メタボライト溶解用 Milli-Q 水でサンプルを溶解し、CE-MS 分析に供した。このメタボライト溶解液には、事前に時間補正用内部標準物質 H3304-1004 (Human Metabolome Technologies) を終濃度 $25 \mu\text{M}$ となるように添加した。

3-2-4-2 RNA 抽出用の菌体

菌体培養液を回収して遠心分離 (4°C , 15000 rpm, 1 min) した後、液体窒素で急冷し、RNA 実験まで -80°C で保存した。

3-2-5 各種成分の測定

菌体濃度、グルコース濃度、有機酸濃度、エタノール濃度、溶存酸素濃度、乾燥菌体重量の測定は、第 2 章と同様の手法で行った。

3-2-6 CE-MSによる中間代謝産物分析

3-2-6-1 分析条件と測定

キャピラリー電気泳動質量分析は、CE-MS Agilent 7100 CE、Agilent 6224 TOF LC/MS (Agilent Technologies) を用いて行った。CE には、フューズドシリカキャピラリー (H3305-1002; 80 cm × 0.05 mm ID; Human Metabolome Technologies) を用い、また泳動バッファとして陰イオン用分析用バッファ (H3302-1021; Human Metabolome Technologies) を使用した。また、50 mbar の圧力をサンプル注入口に 25 秒間かけることでキャピラリーにサンプルを導入した。そして、キャピラリーに+3000 V の電圧をかけ、さらに 15 mbar の圧力をかけることでサンプルを泳動し、単一成分へと分離させた。CE 部と MS 部の連結部分では、シース液として CE-MS 用シース液 (H3301-1020; Human Metabolome Technologies) を 1 mL/min で送液した。泳動バッファ中の代謝物質は、300 °C の窒素ガスを 7 L/min で吹き付けることによりイオン化した。MS 部では質量電荷比 (m/z) が 50–1000 の範囲でサンプルに含まれる陰イオンを 1.5 cycle/sec. で分析した。

3-2-6-2 ^{13}C 濃縮度の定量

CE-MS による化合物のイオン化はフラグメント化を伴わないため、ターゲットイオンの質量および炭素数に由来する質量電荷比のマススペクトルから ^{13}C 濃縮度を取得し、2 章と同様に天然同位体の補正を行った。

3-2-6-3 中間代謝産物量の定量

ある時点のサンプルから測定された中間代謝産物の、 ^{13}C 濃縮度を構成する全質量荷電比の強度の和を算出した。 ^{13}C の含まれない実験系であれば、測定対象本来の質量が反映される質量電荷比だけの値を求めればよいが、今回の実験系では ^{13}C が炭素骨格に複数含まれるため、可能性のある最小から最大の質量荷電比の和を求めた。一方、内部標準物質は定量する段階において添加したので、天然同位体に由来する ^{13}C 以外は含まれないため、内部標準物質が取り得る最大の質量荷電比の強度だけを求めた。そして、内部標準物質の強度に対する対象化合物の強度の割合を求めた。次に、内部標準物質の強度に対する、濃度が既知である標準物質の強度割合を求め、サンプル中に含まれていた対象化合物の濃度を算出した。この値は回収した菌体量に由来しており、今回は菌体濃度 (OD_{600}) と培養液 (mL) の積が 30 となるよう調整した。そのため、各時間において実測した OD_{600} と乾燥菌体重量をもとに、乾燥菌体重量あたりの代謝物質の量を算出した。また、大腸菌 1 細胞あたりの菌体体積、重量をそれぞれ 4.96×10^{-16} L と 2.8×10^{-13} g とし、代謝物質の細胞内濃度を算出した。

3-2-7 *pgi* 遺伝子発現量解析

3-2-7-1 Total RNA の抽出

細胞溶解液として、終濃度 1 mg/ml リゾチーム水溶液を調整した。調整にあたり、リゾチームを 10 mM Tris・HCl と 1 mM EDTA から成る TE バッファ (SIGMA) に溶解させ、それを室温で 5 分間インキュベートすることで酵素の活性を高めた。液体窒素で冷凍した約 1×10^7 個の菌体サンプル (YUEC04 株、YUEC00 株、JWK3985 株) にこのリゾチーム溶液を 200 μ l 加え、攪拌した後 (10 sec.)、室温で 10 分間インキュベートした。この間 2 分毎に攪拌を行った。次に添付のマニュアルに従って、RNeasy Mini Kit (QIAGEN、Germany) を用いて RNA の抽出を行った。そして、NanoDrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC、USA) を用いて抽出した RNA 濃度を定量した。

3-2-7-2 逆転写反応

抽出した RNA の逆転写は PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio、Japan) を用いて行った。4 μ l の 5 \times PrimeScript Buffer (for Real Time)、1 μ l の PrimeScript RT Enzyme Mix I、1 μ l の Random 6 mers (100 μ M)、800 ng の RNA、そして、RNase free water を全量が 20 μ l となるように加えた。これらに必要な試薬は氷上で混合した。そして、混合液を 37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートすることで逆転写反応を行い、次に 85 $^{\circ}$ C で 5 秒間インキュベートすることで逆転写酵素の熱失活を行った。サンプルは使用まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

3-2-7-3 Linear plasmid の作成

pgi および *gapA* 遺伝子をクローニングしたプラスミド pGEM-T-*pgi*・pGEM-T-*gapA* (Usui *et al.* 2012) を LaboPass Mini Plasmid DNA Purification Kit を用いて精製した。次に、このプラスミドを *Nde*I で処理し、MinElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN) を用いて精製した。そして、それぞれの濃度を NanoDrop 2000 を用いて定量した。

3-2-7-4 リアルタイム RT-PCR

Fast SYBR Green Master MIX (Applied Biosystems) および StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて、*pgi* 遺伝子の発現量解析を行った。検量線として、*gapA* 遺伝子をおよび *pgi* 遺伝子を挿入した linear plasmid を適宜希釈し、反応に用いることで検量線を作成した。一方、逆転写サンプルは DNase free water で 10 倍に希釈した。反応溶液には 2 μ l の各サンプル、10 μ l の Fast SYBR Green Master Mix (2 \times)、0.4 μ l の Forward Primer (10 pmol/ μ l)、0.4 μ l の Reverse Primer (10 pmol/ μ l)、7.2 μ l の DNase free water を加えた。反応は 40 サイクル繰り返した。各サイクルは、60 $^{\circ}$ C で 30 秒間の伸長反応、95 $^{\circ}$ C で 3 秒間の DNA を一本鎖へ解離させる反応から構成した。*pgi* 遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子と言われている *gapA* 遺伝子の発現量に対する相対値として求めた。

3-2-8 代謝フラックス解析

代謝フラックス分布を求める代謝経路を Fig. 3-3 に、含まれる代謝反応を Table 3-2 に示した。中央代謝経路を再現する代謝モデルには解糖系、TCA サイクル、ペントースリン酸経路、ED 経路、そして、グリオキシル酸経路が含まれる。代謝モデル以外に関しては2章にまとめた内容と同一である。

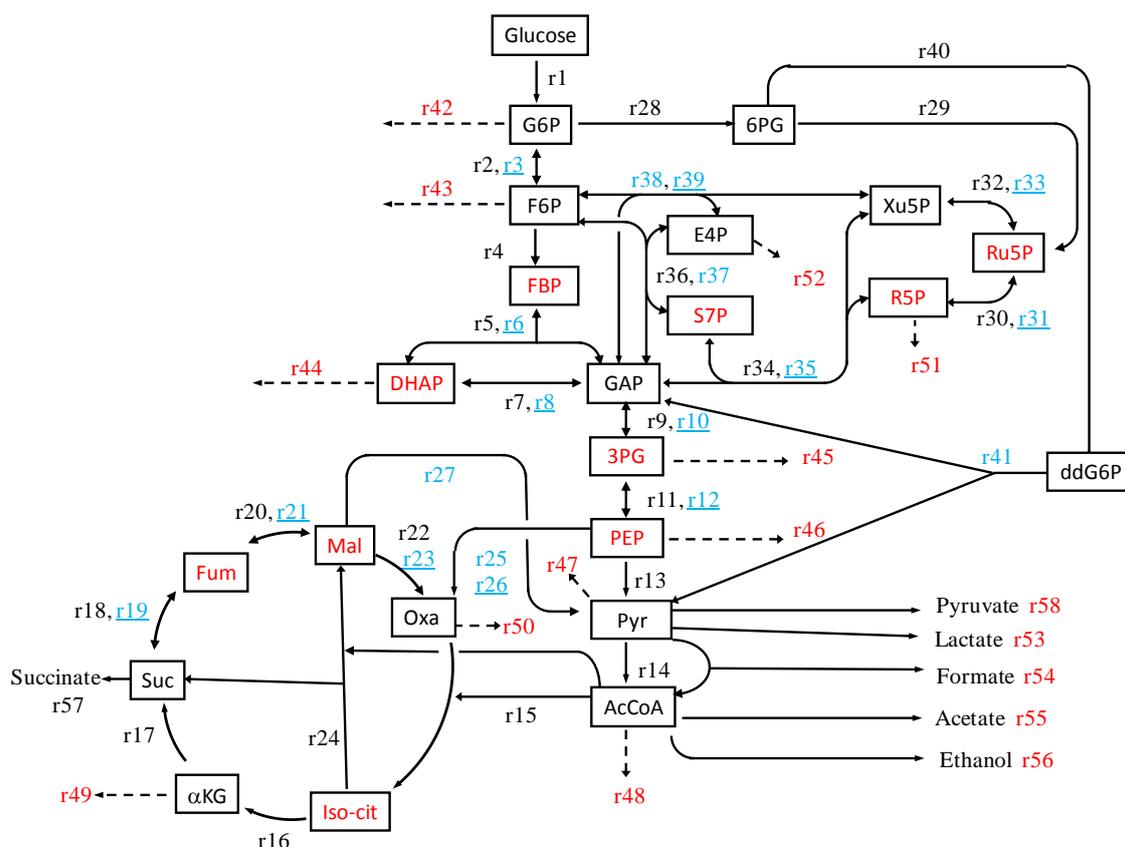


Fig. 3-3 大腸菌の代謝モデル

解糖系、TCA サイクル、ペントースリン酸経路、ED 経路そして、グリオキシル酸経路を代謝経路として含んでいる。リアクション No.が2つあるものに関しては下線で示される逆反応があることを意味し、リアクション No.の個々の反応は Table 3-2 に示した。黒枠の赤字は代謝フラックス解析の入力情報として使用された中間代謝産物である。黒破線部分の赤色のリアクション No.は菌体構成成分を示し、黒実線部分の赤色のリアクション No.は有機酸などである。共に系外へ抜け出した物質であり、実測値より求められた解析に使用した入力値である。一方、青色のリアクション No. が求めるべき代謝フラックスであり、この代謝フラックスが決定されると他の代謝フラックスを決定できる。

Table 3-2 大腸菌の代謝反応モデル

Flux num	Reaction	Flux num	Reaction
r1	Glc --> G6P	r30	Ru5P --> R5P
r2	G6P --> F6P	r31	R5P --> Ru5P
r3	F6P --> G6P	r32	Ru5P --> Xu5P
r4	F6P --> FBP	r33	Xu5P --> Ru5P
r5	FBP --> DHAP + GAP	r34	R5P + Xu5P --> S7P + GAP
r6	DHAP + GAP --> FBP	r35	GAP + S7P --> Xu5P + R5P
r7	DHAP --> GAP	r36	GAP + S7P --> F6P + E4P
r8	GAP --> DHAP	r37	E4P + F6P --> S7P + GAP
r9	GAP --> 3PG	r38	E4P + Xu5P --> F6P + GAP
r10	3PG --> GAP	r39	GAP + F6P --> Xu5P + E4P
r11	3PG --> PEP	r40	6PG --> dd6PG
r12	PEP --> 3PG	r41	dd6PG --> Pyr + GAP
r13	PEP --> Pyr	r42	G6P --> Biomass
r14	Pyr --> AcCOA + CO2	r43	F6P --> Biomass
r15	AcCOA + Oxa --> IsoCit	r44	DHAP --> Biomass
r16	IsoCit --> aKG + CO2	r45	PGA --> Biomass
r17	aKG --> Suc + CO2	r46	PEP --> Biomass
r18	Suc --> Fum	r47	Pyr --> Biomass
r19	Fum --> Suc	r48	AcCOA --> Biomass
r20	Fum --> Mal	r49	aKG --> Biomass
r21	Mal --> Fum	r50	Oxa --> Biomass
r22	Mal --> Oxa	r51	R5P --> Biomass
r23	Oxa --> Mal	r52	E4P --> Biomass
r24	IsoCit + AcCOA --> Mal + Suc	r53	Pyr --> [Lactate]
r25	PEP + CO2 --> Oxa	r54	Pyr --> AcCOA + [Formate]
r26	Oxa --> PEP + CO2	r55	AcCOA --> [Acetate]
r27	Mal --> Pyr + CO2	r56	AcCOA --> [EtOH]
r28	G6P --> 6PG	r57	Suc --> [Succinate]
r29	6PG --> Ru5P + CO2	r58	Pyr --> [Pyr]

括弧は、Biomass と同様に、代謝経路の系外へ抜ける物質を意味する。

3-3 結果と考察

3-3-1 グルコース比消費速度と有機酸比生産速度の経時変化

本実験では、代謝状態が変化する過程において、その代謝フラックス分布の遷移を捉えることを目的とした。そのため、連続培養系において大腸菌の代謝状態が定常である状態から IPTG の濃度を減少させることで、*pgi* 遺伝子の発現量を変化させ、それによって生じる代謝状態の変化を解析した。培地に一定量の IPTG を加えた状態、つまり *pgi* 遺伝子が発現できる状態から始め、それから IPTG を含まない培地に切り換えた。培地中の IPTG 濃度は、連続培養の希釈率に従って徐々に低下し、それに起因して *pgi* 遺伝子の発現量も減少した（後述）。IPTG の濃度変化の理論値と培養槽中の各成分の比生産速度を Fig. 3-4 に示した。

Fig. 3-4 において、代謝状態が定常状態となっている 40 時間で ^{13}C 培地に切り換えており、それ以降も培養槽の菌体が 5 回分入れ換わるだけの時間を経過させ、菌体を構成するほぼ 100 % の炭素が ^{13}C 培地由来のものとなる時点まで定常状態を維持した。つまり、培地の切り換え操作、天然同位体である ^{13}C が菌体に取り込まれることによる代謝状態の変化は無視できることを意味している。加えて、65 時間からは IPTG を含まない ^{13}C 培地に切り換え、IPTG の濃度が低下した 80 あるいは 85 時間付近から 110 時間にかけて酢酸比生産速度、ギ酸比生産速度の変化が顕著に見られた。これらのことから、今回の代謝の変化は、IPTG 濃度の減少に依存した変化であることが示唆された。

110 時間付近からはそれまでと異なった傾向の著しい代謝状態の変化が見られた。グルコース比消費速度とギ酸、そして、酢酸の比生産速度の増加が著しい点、ピルビン酸の再取り込みが行われている点でそれ以前とは大きく異なった挙動を示した。また、120 時間においては 40 時間目の代謝状態に近いものとなった。データは記載していないが、予備実験においても同様の培養挙動を示し、120 時間以降も 40 時間目と同様の状態が続いた。この培養挙動の変化は、*pgi* 発現の抑制が解除されるリーク発現が起きている株の出現によって引き起こされたと予想される。*pgi* 遺伝子の発現が抑制されることによって、取り入れたグルコースの多くは、解糖系ではなく、ペントースリン酸経路から菌体合成やエネルギー生産に用いられることが予想される。ゲノムスケール代謝モデルを用いた *in silico* 解析からは、このような代謝状態の変化によって菌体収率は低下すると予想され (Fist *et al.*, 2007)、実際に *pgi* 破壊株の菌体収率は低下する (Usui *et al.*, 2012)。*lac* オペロンを利用した遺伝子の制御において、リーク発現が起きることは一般に知られている。*pgi* 遺伝子の発現抑制が解除された菌体が培養槽に出現すると、それは比較的高い菌体収率を持つために、結果として集団全体がその株に乗っ取られ、*pgi* 遺伝子の発現抑制が続いている菌体を淘汰すると考えられる。110 時間以降の培養挙動は、このような発現抑制の解除に起因すると予想され、リアルタイム RT-PCR の結果（後述）はそれを支持している。また、この 110 時間以降の培養ではピルビン酸の取り込みが起

きており、¹³C グルコースのみによって標識が行われておらず、それ以前の時間帯における培養条件とは異なっており、同じ手法では代謝フラックス解析を行うことができない。これらの要因は今回の培養系から得られたサンプルや解析の一貫性を欠くことに繋がるため、110 時間付近以降については、代謝フラックスの変化を定量できないものと判断し、それ以前の時間帯について議論してゆく。

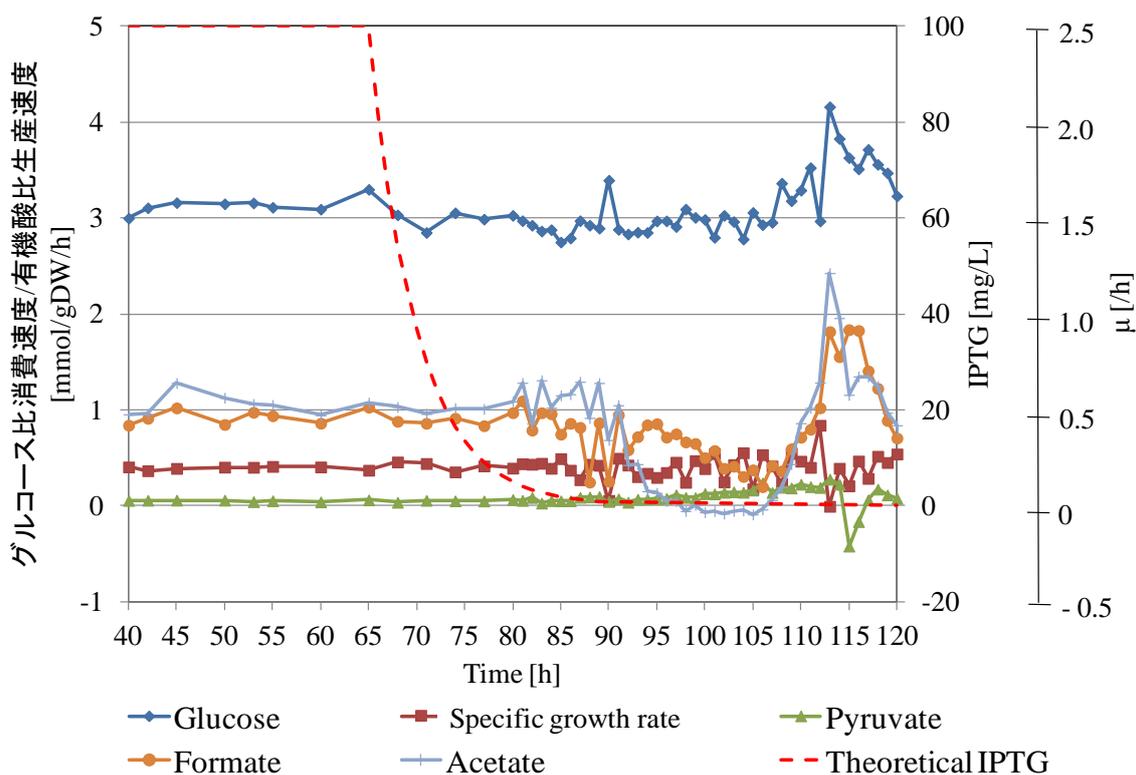


Fig. 3-4 代謝状態の経時変化

横軸は培養時間であり、縦軸はグルコース比消費速度、菌体の比増殖速度、ピルビン酸比生産速度、ギ酸比生産速度、酢酸比生産速度を表している。縦第二軸は連続培養の希釈率より求められた IPTG の理論濃度であり、 $C_{IPTG} = C_0 \times e^{-Dt}$ より求めた。ここで C_0 は初期 IPTG 濃度 100 [mg/L]、 D は希釈率 0.2 [1/h]、 t は経過時間[h]とした。

3-3-2 *pgi* 発現量の経時変化

上述の培養系において、IPTG の濃度変化によってどのように *pgi* 発現量が変化したのかを解析するために、その発現量の経時変化をリアルタイム RT-PCR により定量した (Fig. 3-5)。横軸は株名、もしくは YUEC04 株の培養実験における回収した時間を表しており、縦軸は *pgi* 遺伝子発現量の YUEC00 株に対する相対値である。コントロール株である YUEC00 株はゲノム上に本来のプロモータで駆動される *pgi* 遺伝子を持っている。この株の発現量を 1 と置き、YUEC04 株の各時間における発現量を定量した。また、定量の手法として相対定量法を採用し、常に一定量の mRNA を転写するハウスキーピング遺伝子である *gapA* 遺伝子を補正用の mRNA として利用した。そして、JWK3985 株は *pgi* 完全破壊株であり、検出限界下という妥当な値を示した。

連続培養は IPTG を含む培地で開始し、含まない培地へは 65 時間後に切り換えた。これ以前の発現量を確認すると標準偏差の大きな 60 時間の結果を除くとコントロール株に対して約 15 倍以上の発現量を持っており、最初のサンプルに当たる 40 時間と 65 時間に限れば、発現量は 20 倍以上となった。一方、68 時間以降のサンプルでは、68 時間のサンプルの標準偏差が大きいものの、時間経過に伴い発現量が 20 付近から 0 に近づく結果となった。この発現量の変化は IPTG の濃度変化とおよそ連動するものであり、IPTG の濃度変化に発現量変化が追従していることを示唆している。つまり、先に述べた代謝変化は、G6P からの代謝フラックスが解糖系からペントースリン酸経路へと切り換わったことに起因すると予測される。この結果より、意図した通りの G6P 周辺の大きな代謝フラックスの変化を起こすことに成功したといえる。また、この発現量変化の結果からコントロール株の発現量が代謝の切り換わりに重要な意味を持つことが示唆された。ギ酸や酢酸の比生産速度の変化から代謝の変化は 85 時間付近から緩やか始まっている。この 85 時間と近傍である 90 時間の *pgi* 発現量を解析した結果、それぞれコントロール株に対して 1.5 倍と 0.8 倍となった。つまり、コントロール株である YUEC00 株の発現量に近いある閾値を下回ることによって代謝状態の変化が始まった可能性がある。逆に、閾値以上の発現量があれば代謝状態に特に影響を及ぼさないことが考えられる。実際、Fig. 3-4 において 85 時間以前の各最終代謝産物の比生産速度はほぼ一定であるものの、IPTG の減少が始まった 65 時間から 85 時間までの発現量は明らかに減少傾向にある。そのため、コントロール株に近いある発現量が代謝変化の閾値として機能していたことが仮定される。110 時間以降における代謝状態について言及し、40 時間と類似した状態に向かうように見えたことと述べたが、118 時間における発現量は 1.3 であった。代謝の変化が起きると示唆される閾値である 1.5 から 0.8 の間にあり、この仮定から代謝状態の変化が説明付けられる。

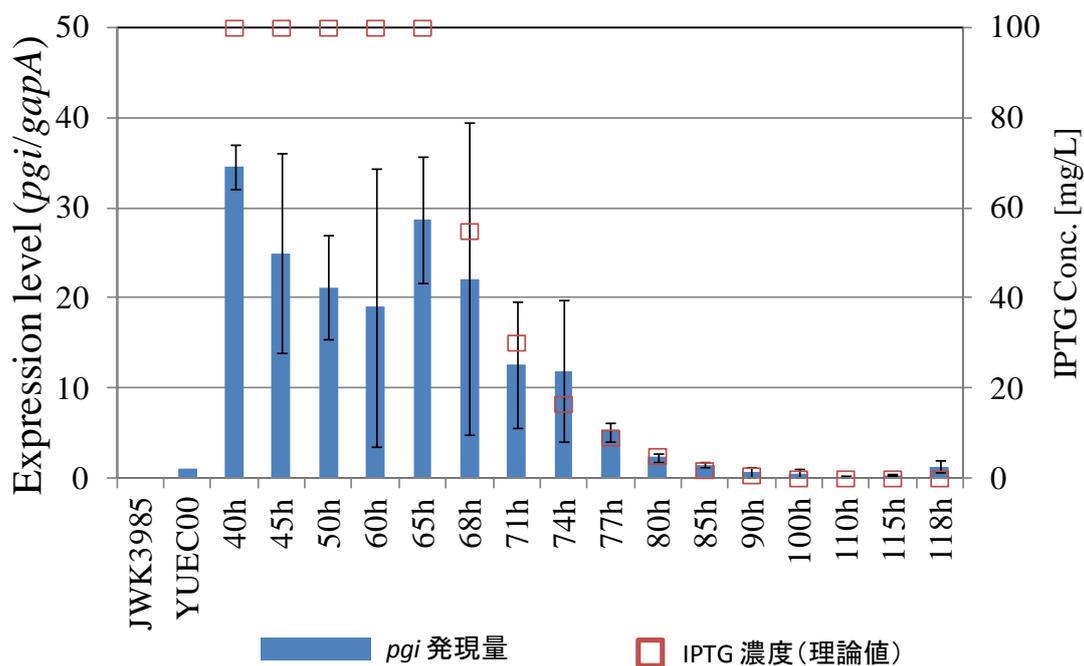


Fig. 3-5 *pgi* 発現量と IPTG 濃度の経時変化

横軸の JWK3985、YUEC00 はそれぞれ *pgi* 完全破壊株、ネイティブ *pgi* と空ベクターを持つ株であり、時間は YUEC04 株を連続培養において回収した時間を表す。第一縦軸は相対発現量であり、YUEC00 の発現量を基準とする。それぞれの値は独立したサンプルを 3 回測定した結果の平均値であり、エラーバーは標準偏差である。目的の遺伝子である *pgi* の発現量を発現量が一定であるハウスキーピング遺伝子 *gapA* の発現量で割ることでサンプル間の菌体量の違いを補正した。第二縦軸は IPTG 濃度を示す。

3-3-3 代謝フラックス解析

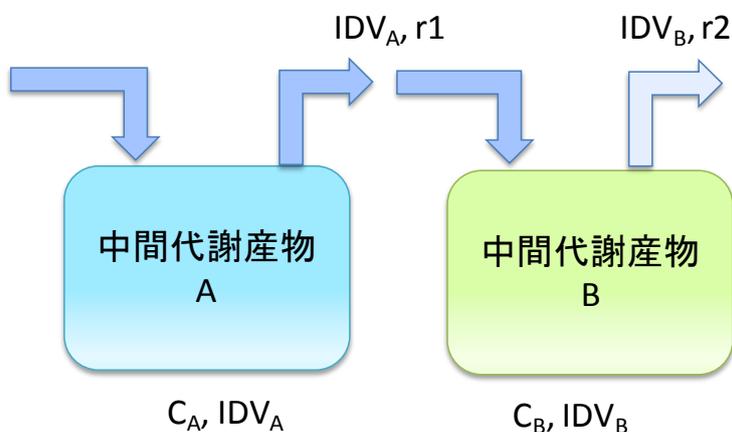
2章の実験材料と実験手法で触れたように、一般に代謝フラックス解析では、ある中間代謝産物 (IM) の流入量と流出量がバランスしており、その蓄積量に変化がないという制約を持つ。中間代謝産物 A と B を例にして B についての物質収支式を構築すると式 3-1 のようになり、さらに変形させると式 3-2 となる (Fig. 3-6)。物質収支式の左辺は、蓄積量変化と標識情報の積、蓄積量と標識情報変化の積、この2つの積の和から構成される。従って、正確には代謝フラックス解析では蓄積量変化、標識情報に変化がない、代謝的定常状態を仮定している。一方、本章における代謝フラックス解析は代謝状態が変化している系を対象としており、求めるべき代謝モデルを構成するそれぞれの IM の蓄積量、標識情報が一定とみなせるか確認する必要がある。

$$\frac{d(C_B \times IDV_B)}{dt} = r1 \times (IMM_{A \rightarrow B} \times IDV_A) - r2 \times IDV_B = 0$$

式 3-1

$$\frac{dC_B}{dt} (IDV_B) + C_B \frac{d(IDV_B)}{dt} = r1 \times (IMM_{A \rightarrow B} \times IDV_A) - r2 \times IDV_B = 0$$

式 3-2



$$\frac{d(C_B \times IDV_B)}{dt} = r1 \times (IMM_{A \rightarrow B} \times IDV_A) - r2 \times IDV_B = 0$$

Fig. 3-6 中間代謝産物 B の物質収支式の模式図と式

模式図中の r [mmol/gDW/h] は代謝フラックスを表し、 C は乾燥菌体重量当たりの蓄積量 [mmol/gDW] を表す。また、 IDV は標識情報を意味する行列である。そして、数式は中間体者産物 B の物質収支式である。

IM の蓄積量変化を確認するために、後述する代謝フラックス解析に用いた IM、加えて、数種の IM の蓄積量を定量した。定量法には内部標準法を適用した。その結果、各 IM の濃度は erythrose-4-phosphate (E4P) の約 10 μM から G6P の約 16000 μM までの広い濃度幅を持つことが判明した (Fig. 3-7 上図)。先行研究として、Chassagnole らと Toya らが大腸菌の野生株における IM の定量を行っており、その蓄積量は、E4P の数十 μM から G6P、3-phosphoglycerate (3PG)、そして、phosphoenolpyruvate (PEP) の数千 μM までの値を持つことが報告されている (Chassagnole *et al.*, 2002、Toya *et al.*, 2012)。今回の測定結果において、G6P の濃度が一桁高い理由については対象が *pgi* 破壊株であり、基質である G6P が特に蓄積し易い環境にあったためと考える。従って、培養条件が同一でないため、物質毎の濃度は異なるものの、取り得る濃度幅は概ね一致しており、妥当な結果であった。また、その濃度変化は E4P、G6P、6-phosphogluconate (6PG) といった IM においては 85 時間付近から起き、40 時間と比較すると 50 - 250 倍を超え、最終的には 40 時間と同程度に戻った (Fig. 3-7 下図)。従って、代謝変化を有機酸の比速度だけでなく、IM の濃度変化の観点からも捉えることができたといえる。そして、特にこれら 3 つの物質は、解糖系への代謝経路が詰まり、ペントースリン酸経路への流量が増加したために蓄積したことが予想される。この事実は *pgi* 遺伝子の発現量が低下した結果に対して妥当である。さらに、濃度変化が起き始めた時間は 85 時間から 90 時間であり、先述した代謝状態が変わり始める発現量の閾値が存在すると予想される時間にも一致する。

次に、図の縦軸を細胞内濃度である μM ($\mu\text{mol/L}$) から乾燥菌体重量あたりの絶対量である $\mu\text{mol/gDW}$ に変換したものが Fig. 3-8 である。この変換において大腸菌 1 細胞あたりの菌体体積、重量はそれぞれ $4.96 \times 10^{-16} \text{ L}$ と $2.8 \times 10^{-13} \text{ g}$ とした。この図における重要な点は、IM の増加量を傾きから求めることができる点である。ここで式 3-2 について、単純化のために IDV が一定であると仮定し、蓄積量変化にのみ着目すると式 3-3 となる。式 3-3 は中間代謝産物 B において、その流入フラックスと流出フラックスが同一であれば蓄積量変化はないことを意味している。このとき、ある IM について、Fig. 3-8 の傾きから求められる蓄積量変化に対して、その生成・消費の代謝フラックスが十分に小さければ、式 3-3 が近似的に成り立っていると見なすことができる。

$$\frac{dC_B}{dt} = r_1 - r_2 = 0$$

式 3-3

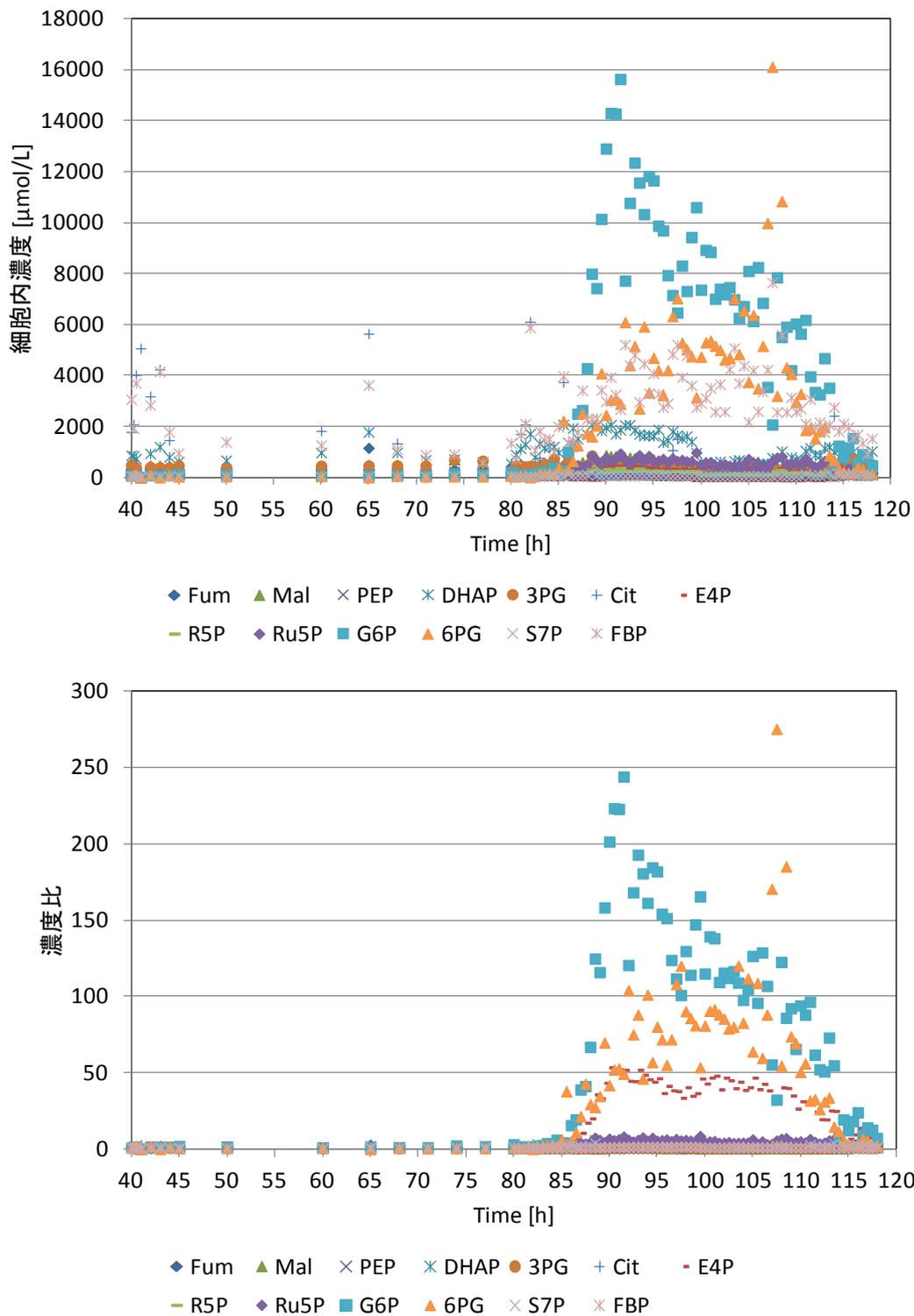


Fig. 3-7 中間代謝産物の細胞内濃度と量比の経時変化

縦軸は上図では中間代謝産物の細胞内濃度、下図では濃度比を表す。濃度比に関しては 40 時間における細胞内濃度を基準としている。横軸はともに培養時間を表す。各中間代謝産物の略字は Appendix にまとめた。

以下に G6P を例に挙げて説明する。G6P の流入フラックスはグルコースの取り込み量として実測可能であり、その値は 3 mol/gDW/h 程度であった (Fig. 3-4)。次に、IM の蓄積量増加に関与する代謝フラックスを蓄積フラックス、蓄積量減少に関与する代謝フラックスを消費フラックスと定義した。Fig. 3-8 の A、B のラインはそれぞれ G6P の増減の傾きが最も急な部分であり、蓄積フラックス、消費フラックスの最大値を意味する。そして、それらの値はそれぞれ 4.6、-1.5 $\mu\text{mol/gDW/h}$ であった。つまり、全培養時間を通して最大限に G6P が蓄積しても、あるいは最大限に G6P の蓄積が消費しても、流入フラックスである 3000 $\mu\text{mol/gDW/h}$ に対して最大で 5 $\mu\text{mol/gDW/h}$ 、0.2 % 未満の影響しか及ぼさない。従って、単位時間、菌体あたりの蓄積量変化はほとんどなく、流出フラックスは流入フラックスとほぼ同一の値といえる (Fig 3-9)。この結果は式 3-3 を近似的に満たすと考えることができる。そして、式 3-3 は本来式 3-2 の左辺において、蓄積量変化と標識情報の積の形で求められる部分にあたるため、これを 0 に近い値にできる (式 3-4)。

$$\frac{dC_{G6P}}{dt}(\text{IDV}_{G6P}) = 0$$

式 3-4

次に代謝モデルに含まれる他の IM についても式 3-4 と同様のことが成り立つのか確認した。代謝モデルに含まれる代謝経路の代謝フラックスは求められたが、IM によっては CE-MS で測定できなかった物質も含まれる。そのため、蓄積、消費フラックスの値には、測定可能であった IM の中でその値が最大であった G6P の値を採用した。また、物質の蓄積量変化に着目する場合、蓄積、消費フラックスはそれぞれ正と負の値を取るため、大きな値を持つ方だけの影響を考慮すればよい。従って、各 IM に対する G6P の蓄積フラックスの影響を調べた (Table 3-3)。例に挙げた 4 つの時間点は代謝的定常状態にあたる培養 71 時間後のサンプルから 10 時間毎の結果である。最大時間に関しては先に述べた理由より 100 時間までとした。その結果、解糖系における流入フラックスに対する蓄積フラックスは 1.1 % 未満となり、ペントースリン酸経路では 2-4 %、TCA サイクルでは 2.2 % 未満となった。一方、補充経路では Malate (Mal) から Pyr への流入フラックスでは 15.2 % となり、その値は最大となった。しかしながら、今回の使用株である YUEC04 株は *Δpgi* 破壊を再現できる株であったことを考慮する必要がある。その最大蓄積量は先述した通り、先行研究と比較してもオーダー単位で異なるものであり、G6P の蓄積フラックスは極めて大きなものであったと予想できる。つまり、Table 3-3 にまとめた値は、流入フラックスに適切な値を用いたグルコースから G6P への値以外は、実際はより小さな値であることが推測される。従って、代謝フラックス解析の物質収支式 (式 3-2) の蓄積量変化に関わる部分 (G6P の場合は、式 3-4) は 0 と見なせるため、代謝モデルを構成する IM の単位時間、菌体あたりの蓄積量の変化は無視できると結論付けられる。

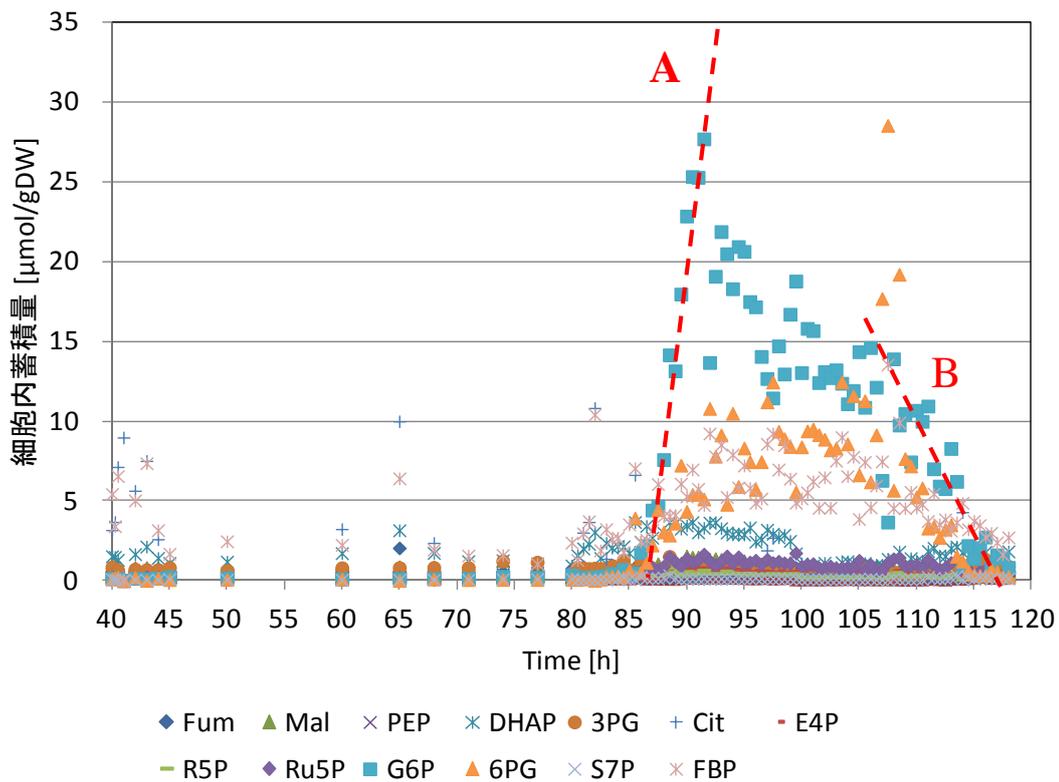


Fig. 3-8 中間代謝産物の細胞内蓄積量の経時変化

Fig. 3-7 の縦軸とは単位が異なり、菌体あたりの物質を表している。A と B の赤い破線は濃度勾配の増減が最も急な部分の傾きを示している。

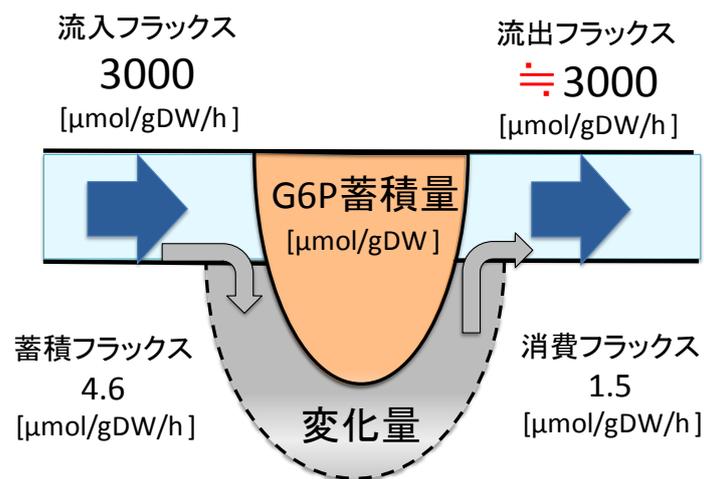


Fig. 3-9 Glucose 6 phosphate の蓄積量変化の模式図

蓄積フラックスと消費フラックスは極めて小さい。単位時間、菌体あたりの G6P 蓄積量変化はなく、流入、流出フラックスはバランスしていると見なせる。

Table 3-3 流入フラックスに対する蓄積フラックスの割合

Reaction	Time			
	71 h	81 h	91 h	100 h
	流入に対する蓄積フラックスの割合			
Glc --> G6P	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%
G6P --> F6P	0.3%	0.5%	1.1%	3.6%
F6P --> FBP	0.3%	0.3%	0.6%	1.0%
FBP --> DHAP + GAP	0.3%	0.3%	0.6%	1.0%
DHAP --> GAP	0.3%	0.3%	0.7%	1.1%
GAP --> 3PG	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
3PG --> PEP	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%
PEP --> Pyr	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%
Pyr --> AcCOA + CO ₂	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%
AcCOA + Oxa --> IsoCit	0.3%	0.4%	0.4%	0.2%
IsoCit --> aKG + CO ₂	2.1%	2.1%	1.0%	0.5%
aKG --> Suc + CO ₂	-	-	2.2%	0.7%
Suc --> Fum	0.4%	0.6%	0.6%	0.2%
Fum --> Mal	0.4%	0.6%	0.6%	0.2%
Mal --> Oxa	0.2%	0.3%	0.3%	0.1%
IsoCit + AcCOA --> Mal + Suc	0.4%	0.5%	0.7%	0.2%
PEP + CO ₂ --> Oxa	-1.1%	-2.1%	7.4%	-0.5%
Mal --> Pyr + CO ₂	6.3%	15.2%	-	0.9%
G6P --> 6PG	0.3%	0.2%	-	0.2%
E6PG --> Ru5P + CO ₂	0.6%	0.4%	0.6%	0.7%
Ru5P --> R5P	1.2%	0.9%	1.1%	1.3%
Ru5P --> Xu5P	1.3%	0.8%	1.4%	1.4%
R5P + Xu5P --> S7P + GAP	2.1%	1.4%	2.2%	2.3%
GAP + S7P --> F6P + E4P	2.1%	1.4%	2.2%	2.3%
E4P + Xu5P --> F6P + GAP	3.2%	1.9%	3.8%	3.4%
6PG --> dd6PG	0.7%	0.5%	0.3%	0.2%
dd6PG --> Pyr + GAP	0.7%	0.5%	0.3%	0.2%

蓄積フラックスは測定可能であった中間代謝産物中で最大であった G6P の 4.6 $\mu\text{mol/gDW/h}$ を採用し、求められた代謝フラックス（流入フラックス）に占める割合を求めた。マイナスの値は逆反応を意味している。流入フラックスが 0 付近の物質については蓄積が無いとして、-で表した。

以上の結果から式3-2の左辺の蓄積量変化に関わる成分はほぼ無視できるものであることが分かった。残るは左側の蓄積物質の標識情報の変化がないものと見なせるかである。式3-2において、濃度変化がなく、流入と流出フラックスが一定の条件と置くと式3-5となる

$$\frac{dC_B}{dt}(\text{IDV}_B) + C_B \frac{d(\text{IDV}_B)}{dt} = r_1 \times (\text{IMM}_{A \rightarrow B} \times \text{IDV}_A) - r_2 \times \text{IDV}_B = 0$$

式3-2

$$\frac{d(\text{IDV}_B)}{dt} = \frac{r_1}{C_B} ((\text{IMM}_{A \rightarrow B} \times \text{IDV}_A) - \text{IDV}_B) = 0$$

式3-5

ここで、 r と C は定数であり、変数は IDV_A と IDV_B である。従って、 IDV_B の変化がないことを満たす解は、 $\text{IMM}_{A \rightarrow B} \times \text{IDV}_A$ と IDV_B が同じ値を持つときとなる。今回の代謝が変化している環境下において、この式を満たすと見なせる条件は、 IM の標識が代謝状態の変化と比較して十分に短い時間スケールで起こる場合に対応する。そして、大腸菌において、中間代謝物質の標識割合が一定となるのは数秒から数分程度であることがNöhらによって報告されている(Nöh *et al.*, 2007)。そして、Toyaらは、回分培養に対して定常状態に基づいた代謝フラックス解析を適用し、その代謝変化を部分的に明らかにしている(Toya *et al.*, 2007)。その際、10時間程度のタイムスケールの代謝変化は、 IM の標識情報に十分に反映されるとしている。今回、IPTGにより引き起こした代謝状態の変化は先行研究以上の時間をかけて起きている。従って、今回の培養系において数分間という標識時間は観測された代謝状態の変化を測定するためには十分に短いと考えられる。そして、蓄積量と標識情報の変化がないと見なせることから、式3-2は満たされ、これらが代謝フラックス解析へ及ぼす影響は小さいと結論付けられる。

3-3-4 代謝フラックス分布

大腸菌の代謝モデルとして、解糖系、ペントースリン酸経路、TCA サイクル、ED 経路、そして、2 章では組み込まなかったグリオキシル酸経路から構成される中央代謝経路を構築した。グリオキシル酸経路を取り入れた理由はペントースリン酸経路とグリオキシル酸経路のフラックスに相関関係があるためである。大腸菌の主要な NADPH の生産経路として、ペントースリン酸経路中の G6P dehydrogenase (G6PDH) と 6PG dehydrogenase (6PGDH)、そして、TCA サイクル中の isocitrate dehydrogenase (ICDH) が知られている。野生株では TCA サイクルに関わる後者が担う役割が大きい一方、*pgi* 破壊株ではペントースリン酸経路に関わる前者の 2 つが主要な NADPH 生産経路となることが報告されている (Hua *et al.*, 2003)。このとき、*pgi* 破壊株ではペントースリン酸経路での NADPH 生産が過剰となる。そこで、細胞内の酸化還元バランス維持の観点から ICDH への代謝フラックスを低下させるため、TCA サイクルのバイパス経路として位置するグリオキシル酸経路の代謝フラックスを大きくすることが知られる。また、代謝状態が変化する本実験系とは異なり、代謝的定常状態にあるとき IPTG 濃度に依存して YUEC04 株の G6P 周辺およびグリオキシル酸経路の代謝フラックスが同様の変化を起こすことが報告されている (Usui *et al.*, 2012)。このような理由から、グリオキシル酸経路を代謝モデルに組み込んだ。そして、CE-MS によって測定した各サンプリングポイントにおける中間代謝産物 (fructose-1,6-bisphosphate (FBP)、dihydroxyacetone phosphate (DHAP)、3PG、PEP、ribulose-5-phosphate (Ru5P)、ribose-5-phosphate (R5P)、sedoheptulose 7-phosphate (S7P)、citrate (Cit)、fumarate (Fum)、Mal) の ¹³C 標識情報、菌体外へ排出された主要な代謝産物の比生産速度、そして、菌体の生合成フラックスを実測値として代謝フラックス解析を行った。

Table3-3 で取り上げた代謝的定常状態から代謝が変化した状態にある 4 つの時間点の結果を Fig.3-11 に示した。*pgi* 遺伝子の発現量低下によって引き起こされる結果として、解糖系からペントースリン酸経路への代謝フラックスの増大とグリオキシル酸経路の代謝フラックスの増大が予想されるので、これらの点について言及する。前者に関して、4 つの時間の結果を確認すると 71 時間、81 時間、91 時間、100 時間と時間が経過するごとに G6P から解糖系への代謝フラックスは減少した。一方、時間経過に伴い、ペントースリン酸経路への代謝フラックスは増加し、予測通り YUEC04 株が徐々に *Δpgi* 株に近い特徴を示すの結果となった。そして、リアルタイム RT-PCR の結果ではこれらの時間帯の *pgi* 発現量は低下する傾向にあり、代謝フラックス解析の結果を支持するものであった (Fig. 3-7)。一方、グリオキシル酸経路の代謝フラックスは時間の経過に伴って、緩やかに低下してから増加するという予想とは異なる結果となった。しかし、ここで議論されるべきはグリオキシル酸経路の代謝フラックスの増加ではなく、ICDH が触媒する Isocitric acid (IsoCit) から aKG への代謝フラックスの減少についてである。なぜなら、NADPH を生産するのは、ICDH によって触媒される IsoCit から aKG への経路

だからである。Hua らは、*Δpgi* 株が、ペントースリン酸経路における NADPH の過剰生産に対応するため、IsoCit から aKG の流量を抑え、結果的にグリオキシル酸経路の流量が増加することを示している。そこで、IsoCit から aKG への代謝フラックスの 4 点間の推移を確認したが、減少傾向にはなかった。時間経過に伴い、始めの 2 点は一定であり、後半の 2 点では増加する結果となった。この理由として、その他の代謝経路から生産される NADPH の減少が挙げられ、ICDH がそれを補ったと考えられる。NADPH の主要な生産経路は ICDH を除いては、ペントースリン酸経路に存在する G6PDH と 6PGDH であることが判明しており、*Δpgi* 株ではこれら 2 つがほとんどの NADPH の生産を担っていることが知られている。そこで、これら 2 つの酵素が担う代謝フラックスに着目した。すると G6PDH が関わる代謝フラックスは先述の通り、増加傾向を示したが、6PGDH が関わる代謝フラックスにはほとんど変化がなかった。つまり、6PGDH が触媒する代謝フラックスが増加しなかったために、ICDH が関与する代謝フラックスが増加し、NADPH を供給したことが示唆される。そして、時間経過とともに減少した分の代謝フラックスは ED 経路に向かい、その代謝フラックスは増加した。Hua らと Usui らの *pgi* 破壊、*pgi* 破壊再現株では ED 経路の増加は見られたが、このような大きな代謝フラックスの増加ではなかった。これを支持する結果として、Fig. 3-7 下図の E4P の蓄積量変化を挙げることができる。代謝が定常状態から変化する状態へと移行する過程において、E4P 濃度は約 50 倍まで増加している。そして、ペントースリン酸経路への代謝フラックスを増加できない状況にあり、上流に位置する 6PG と G6P が結果的に約 250 までに増加したと考えられる。このような代謝産物の蓄積の原因の一つとして、相対的にグルコース取り込み速度が大きいことが考えられる。酸素供給量が異なる培養状況下において、同じ比増殖速度を維持する場合、エネルギー生産の観点から、より嫌氣的なほど多くのグルコースを取り込む必要がある。第 2 章での Fig. 2-9 もそれを示唆している。従って、好気条件で実験を行った両名よりも、相対的に嫌氣的条件下である本実験系ではグルコースの取り込みが多く、代謝産物がより蓄積し易い条件であったことが示唆される。

以上のことをまとめ、今回の代謝フラックス分布の変化が意味するところを考察する。80 時間付近から代謝の変化が始まると解糖系からペントースリン酸経路へと代謝フラックスが切り換わり、それに伴いペントースリン酸経路上の E4P、6PG といった物質が蓄積した。そして、ペントースリン酸経路では処理できなくなった代謝フラックスは ED 経路を使用することで解糖系の中程へ逃された。さらに、6PGDH で生産できなくなった NADPH は ICDH により補われたと考えられる。

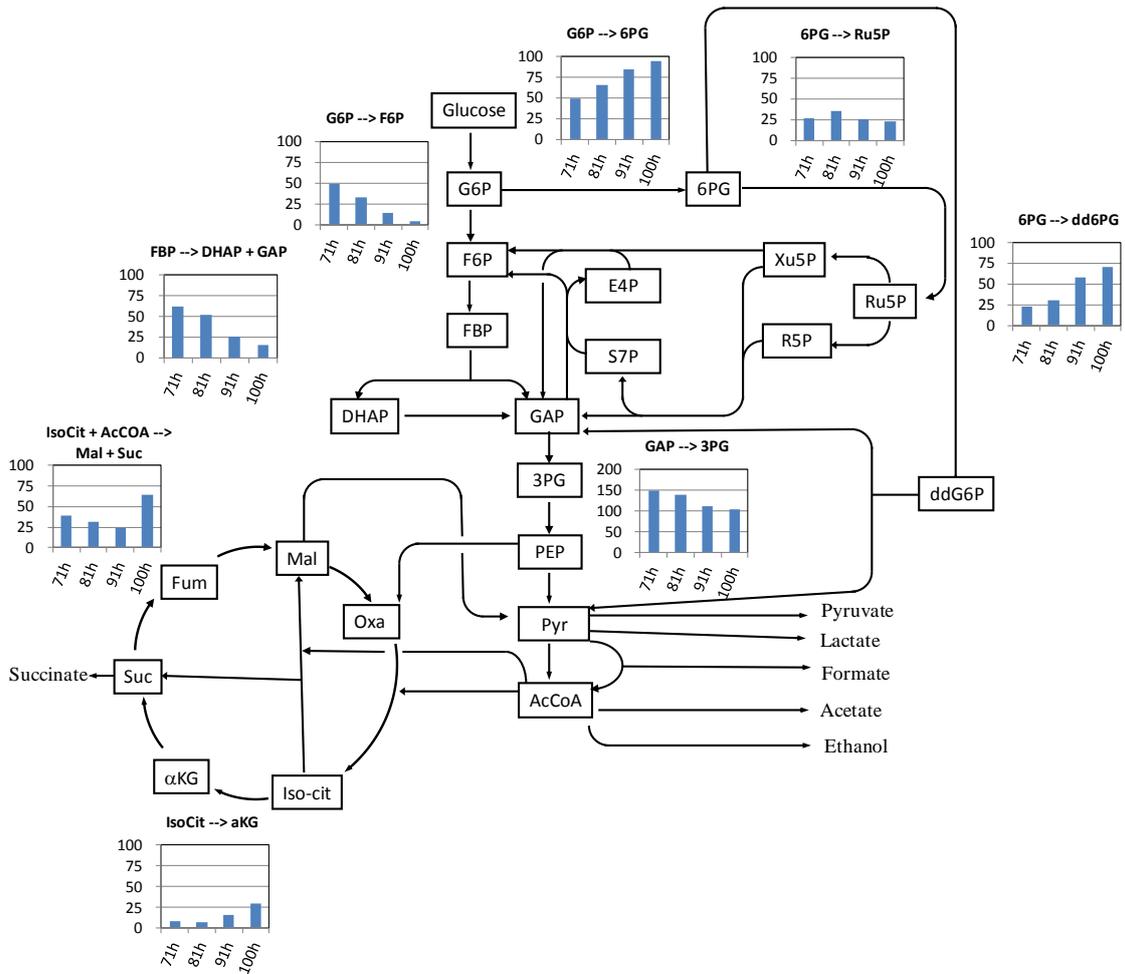


Fig. 3-11 YUEC04 株の代謝フラックス分布

培養 71、81、91、100 時間後の YUEC04 株の代謝フラックス解析結果である。各値はグルコースの取り込み量を 100 としたときの相対値である。各代謝経路の具体的な数値に関しては Appendix として記載した。

3-3-5 Glucose-6-phosphate に関わる代謝フラックスの変化

ここまで連続培養の4点の代謝フラックス分布を例にとり、代謝フラックス分布がどのような性質をもつのか先行研究と比較しつつ、考察した。*pgi* 遺伝子の発現量を徐々に変化させることでペントースリン酸経路やグリオキシル酸経路だけでなく、ED 経路の代謝フラックスも著しく変化するということが示唆された。しかしながら、本章の目的はIMを用いた代謝フラックス解析の適用範囲を明確にすること、具体的には代謝が時間オーダーで変化していてもその変化を追従できるものであるかを明らかにすることである。この目的に対する解を導くためには代謝フラックスの変化が最も確からしい代謝フラックスについて言及する必要がある。G6P から F6P を経由する解糖系の代謝フラックス、及び、G6P から 6PG を経由するペントースリン酸経路の代謝フラックスの変化に関してであれば先行研究が存在し、途中変化は不明であっても最終的な到達点は明確である。また、代謝経路の最も上流に位置し、代謝経路的にその変化を予測しやすい。加えて、*pgi* 遺伝子発現量のリアルタイム RT-PCR の結果、ペントースリン酸経路上の中間代謝産物濃度の変化から代謝フラックスの変化が妥当であったか評価できる。そこで、代謝変化を追従できたか検証するために、G6P からの代謝フラックスについて以下に論じる。

G6P からの代謝フラックスの経時変化を Fig. 3-12 に示した。F6P へ向かう代謝フラックス、6PG へ向かう代謝フラックスともに 60-74 時間、77 時間以降でその挙動が大きく異なるものとなった。60-74 時間の代謝フラックスについて考察すると、その代謝フラックスは安定しており、代謝的定常状態にあったことを示唆している。この時間内である 65 時間から IPTG 濃度を減少させたことにより、*pgi* 遺伝子の発現量は影響を受けている。しかし、コントロール株である YUEC00 株と発現量を比較すると 12 倍ほど高く、代謝レベルでの影響を及ぼすには至らず、有機酸などの比速度 (Fig. 3-4)、中間代謝産物量 (Fig. 3-7) は一定であった。これらの理由から、60-74 時間の代謝フラックスは妥当であると判断する。次に、77 時間以降の代謝フラックスについて考察する。その代謝フラックスは徐々に変化するものであり、G6P から解糖系への代謝フラックスが減少し、G6P からペントースリン酸経路へと切り換わるものであった。*pgi* 発現量はこの時間からコントロール株に近づき始め、77 時間ではコントロール株の約 4 倍、80 時間では約 2 倍、100 時間では 1/10 倍と変化を始めた。この発現量レベルでの変化は有機酸の比生産速度、中間代謝産物量といった代謝レベルにも影響を表し、それぞれ 80 時間付近から影響が出ている。特に G6P、6PG、E4P を中心としたペントースリン酸経路の中間代謝産物量の増加蓄積が顕著であった。これらは 77 時間以降の代謝フラックスが妥当であることを示唆している。

従って、得られた G6P からの代謝フラックスの変化は、遺伝子発現量、有機酸などの比生産速度、中間代謝産物量の変化に対応しており、妥当なものであることが示唆される。

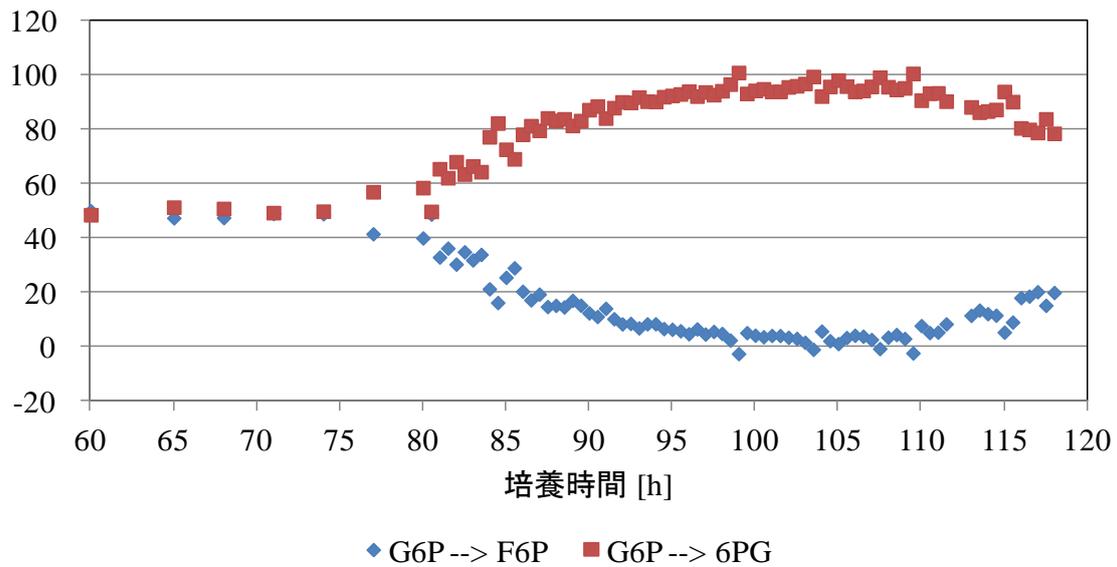


Fig. 3-12 G6P から解糖系またはペントースリン酸経路への代謝フラックスの変化

G6P から F6P (解糖系) への代謝フラックスおよび、G6P から 6PG (ペントースリン酸経路) への代謝フラックスの経時変化を表している。縦軸は、グルコースの取り込み速度を 100 としたときの各代謝フラックスの相対値である。横軸は、培養時間を表す。

3-4 結言

代謝フラックス解析は代謝産物の生産と消費が等量であり、代謝産物の蓄積量と標識情報に変化のない定常状態を仮定している。PAA の標識情報を用いた代謝フラックス解析では、その標識割合が定常に達するまでに数十時間といった比較的長い時間が必要であり、その過程において代謝の定常状態を維持する必要がある。このような長時間の代謝の定常を維持できる培養環境は、連続培養や回分培養の対数増殖期など一部の培養条件に限られ、代謝フラックス解析はこのような条件下の培養に適用されてきた。しかしながら、有用物質生産菌の培養には雑菌の混入、精製コストの抑制の面から流加培養が好まれ、そのような系では数時間といった比較的短い時間スケールでの代謝変化が生じている。そのような系の代謝フラックス解析では、より短い標識時間を持つ解析対象が必要となる。それに対して、中間代謝産物 (IM) の標識時間は数秒から数分であり、その標識情報を用いた代謝フラックス解析は、代謝状態が数時間といった時間スケールで変化する培養系を解析できる可能性を持っている。これまでに、IM の標識情報を利用した代謝フラックス解析を、代謝状態がそのように変化する培養系に適用した前例はない。そこで本研究では、代謝が変化する培養系について、IM の標識情報を利用した代謝フラックス解析を適用し、その代謝状態の変化を解析した。

実験では、培地中の IPTG 濃度により *pgi* 遺伝子の発現量をコントロールできる YUEC04 株の連続培養系を用いた。また、連続培養系の特徴を利用して徐々に IPTG 濃度を低下させることにより、代謝状態の変化を誘導した。そして、有機酸などの比速度、リアルタイム RT-PCR による *pgi* 遺伝子の発現量、IM の濃度、代謝フラックスの経時変化を求めた。

その結果、連続培養では IPTG の濃度変化に依存した有機酸などの比生産速度の変化を誘発できた。また、リアルタイム RT-PCR によって IPTG の濃度変化が予想通り、*pgi* 遺伝子の発現量変化を引き起こしたことが確認できた。そして、得られた代謝フラックスの経時変化は、G6P から解糖系への代謝フラックスがペントースリン酸経路へ徐々に移り変わるものであった。この結果は、先行研究、*pgi* 遺伝子の発現量と代謝経路から予想される結果と一致した。さらに、*pgi* 遺伝子の発現量が十分に押さえられた状態では、ED 経路の代謝フラックスが大きくなる結果を示した。これらの代謝フラックスの変化は IM の蓄積という別の形でも捉えることができ、それが代謝変化と対応していることが示唆された。一方で、代謝状態が変化する培養系に代謝的定常状態を仮定する代謝フラックス解析を適用することによる影響はあるのか考察した。その結果、少なくとも今回の実験系においては、代謝フラックス解析の観点からみて、IM の蓄積量変化は無視することが可能であり、その標識情報は十分に短い時間内に定常に達すると考えられ、代謝変動が定常状態を仮定した解析結果に大きな影響を与えないことが示唆された。

また、今回の実験を通して、次のことが示唆された。数時間のスケールをもつ代謝状態の変化について、IM の蓄積、消費フラックスは、流入フラックスに対して事実上無視できる程度であったということである。培養実験において、代謝変化は長時間に及ぶものであったが、蓄積量変化としても表れているように、大きな代謝の変化は数時間のスケールで起きた。今回、代謝状態の変化に伴う IM の蓄積量の変化を実測し、蓄積フラックスや消費フラックスと定義した単位時間、菌体あたりの蓄積量の増減を確認した。それにより、単位時間、菌体あたりの物質の流入量に比較して、蓄積量の変化は無視できる程度であると判明した。蓄積フラックスや消費フラックスには、IM の中でもその変化が最大であった G6P の値を採用した。この G6P の蓄積フラックスは、通常では起こり得ない *pgi* 破壊株の再現により作り出され、極めて大きなものであったと推測される。しかし、そのような極端な状況であっても単位時間、菌体あたりの流入フラックスと比較すると極めて小さな値であった。従って、少なくとも野生株の環境への応答といった自然にあり得る現象において、蓄積フラックスや消費フラックスは流入フラックスに対して無視できる程度の小さなものであると推測できる。また、今回のように遺伝子破壊株であってもそのように見なせる場合があると示唆される。

4章 結論

4-1 結果のまとめ

代謝フラックス解析は細胞内の代謝状態を定量的に知ることができるため、生物を利用した物作りの指標として適している。代謝フラックス解析は、代謝産物量に変化がなく、標識情報に変化がないと仮定している。そのため、どのような代謝産物の標識情報を用いるにしても、標識が行われる間は代謝状態を一定にする必要がある。タンパク質は量的に多く存在することから、タンパク質由来アミノ酸 (PAA) の ^{13}C 濃縮度の測定は容易とされ、従来法として確立されてきた。しかしながら、量的な多さは標識が定常に達する時間の長さには直結し、標識基質を添加してから数十時間の培養時間を要する欠点がある。そのため、代謝状態を一定に保つことができる連続培養が一般的な適用対象とされてきた。しかし、工業的な物質生産では、雑菌汚染のリスクを回避するために、代謝状態が一定にはない流加培養や回分培養が好まれる。これらの代謝状態が変化する培養系における菌体の代謝状態を解析決するため、遊離アミノ酸 (FAA) や中間代謝産物 (IM) が近年注目を集めるようになった。両者は、流入フラックスに対する蓄積量が相対的に少なく、標識時間が PAA よりも短い。このため、代謝変化のタイムスケールに対して、標識時間が短ければ、代謝状態を一定と見なすことができる。このような有意義な特徴を持つものの、比較的近年になって、その測定法が確立されたため、適用条件に関わる十分な議論が行われていない。その一つとして、FAA の標識時間がある。例えば、流加培養による二段階培養では、高菌体濃度を活かした短時間での物質生産をその特徴としている。しかし、短時間での物質生産であるために、従来の PAA では標識濃縮度が定常に達するまでに至らない。そのために、標識時間が短い FAA を適用する必要性が生じるが、その標識時間が不明確では適用できるか否か判断ができない。また、相対的に最も短い標識時間を持つ中間代謝産物に関しては、代謝変化を追従できるかどうか不明とされてきた。例えば、二段階培養を行う際、代謝状態を切り換えるために、遺伝子発現を制御する薬剤の添加がしばしば行われる。この薬剤を添加するタイミング、滴下量は、菌体の増殖期から物質生産期への代謝状態の変化、それに必要な時間などに関わる。この解析には、代謝状態を連続的なスナップショットとして捉える必要があるが、それが可能であるか否かは、実証されていない。本学位論文では、これら遊離アミノ酸と中間代謝産物の標識情報を用いた代謝フラックス解析について、その実験系の構築と適用範囲の評価を行うことを目的に研究を行った。

第2章では、FAA を利用した解析系の構築とその解析系が持つ特徴までを議論した。実験系の構築に当たり、普遍的な FAA の性質を明らかにすることに重きを置き、3つの酸素供給量を持たせた連続培養系を構築した。さらに、PAA を利用した解析系と比

較することで、絶対的な時間だけでなく、従来法と比較してどの程度短くできたのかを評価した。その結果、 ^{13}C 濃縮度のダイナミクスが一定になるまでの時間は、培養環境の違いによって、1 – 15 時間まで変化することを初めて捉えることに成功した。また、PAA と比較したことで、従来よりも標識時間を 1/25 – 3/5 程度短縮でき、得られた代謝フラックス分布も従来法と同等であることを実証できた。

第3章では、代謝が変化する培養系において、その代謝変化を追従できる解析系の構築を試みた。2章において、FAA の標識時間は短くとも1時間程度と判明したため、その時間が数分であるIMを利用した。実験には、*pgi* 遺伝子の発現量をIPTGにより制御できる大腸菌 YUEC04 株を用いた。これにより、大きな代謝変化を人為的に引き起こすことができた。また、CE-MS を使用することで、微量成分である中間代謝産物の測定にも成功した。そして、代謝状態の変化を有機酸の比生産速度、*pgi* 遺伝子発現量、IM の蓄積量、代謝フラックスの観点から捉えた。特に、30 分間隔で30 時間以上という一連の代謝フラックス解析は、前例のない代謝状態の連続的なスナップショットであった。そして、これらの結果から代謝の変化を追従できたと結論付けることができた。また、今回の実験において、緩やかに代謝が変化する培養系であるとき、代謝的定常状態を仮定できることが分かった。

4-2 得られた知見の寄与するところ

本学位論文では代謝フラックス解析の標識情報として利用される代謝産物、FAA とIMの適用範囲に関わる問題解決を試みた。以下に2、3章から得られた知見が寄与するところについて述べる。

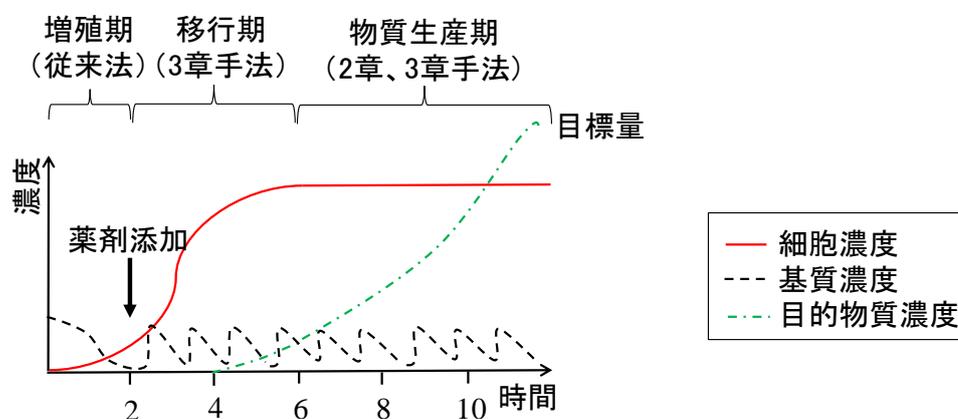
2章のFAAを利用した解析系は、既にIwataniらによって流加培養に適用された前例があり、この解析が変化する培養系に適用できることは既に実証されている(Iwatani *et al.*, 2007)。しかし、その実験において、FAAの標識時間の定量は行われず、その適用範囲までは言及されてはいない。今回、この標識時間が明らかになれば、流加培養へのこの手法の適用範囲を明らかにできると考えた。そして、この標識時間を明らかにするためは、連続培養が適しており、それを用いた培養実験を行った。その結果、FAAの標識時間が1 – 15時間となること、好氣的になるほどその時間が短くなることを実証した。また、その時点において、従来法であるPAAから推定された代謝フラックス分布と同等の結果を得られることも判明した。流加培養において解析が望まれる菌体の代謝状態は、増殖期、移行期(増殖期から物質生産期へと変化する期間と定義する)、物質生産期の3つであり、これらが適用範囲となる。これらの代謝状態がどのような代謝変化のタイムスケールを持つのか説明するため、先行研究を参考に模式図 Fig. 4-1 (A) を作成した(Gerigk *et al.*, 2002, Zhou *et al.*, 2012)。また、今回の代謝産物の標識時間を(B)に示した。移行期は、薬剤の添加をきっかけとしている。そのため、薬剤さえ添加しな

ければ、増殖期の代謝状態を安定に維持することができるため、PAA を含む全ての ^{13}C 代謝産物を利用して解析を行える。しかし、他の 2 つの代謝状態を解析するには PAA の標識時間は長過ぎる。一方、赤字で表される好気条件の FAA の標識時間であれば、物質生産期も適用範囲となることが分かる。しかし、移行期のタイムスケールに対して、その標識時間はまだ長いことも判明した。従って、FAA を利用した代謝フラックス解析は、流加培養において、移行期の解析は難しいが、物質生産期には適用できるものと評価する。また、FAA の標識時間を PAA と比較することで、従来の 1/25 – 3/5 まで時間が短縮できると判明した。この比率の優位性は、簡便な実験系の構築に繋がる点にある。後述するように FAA を利用した解析系は、従来法と同様の手技、装置を用いることができる。そのため、2 章での知見は、 ^{13}C 基質添加後からの培養時間の短縮が求められる際、PAA から FAA を用いた解析に移行可能であるかの指標となり得る。

3 章では、連続培養システムを利用して、代謝が変化する培養系の構築を試みた。*pgi* 遺伝子の発現量は、培養を通して変化しており、代謝状態が変化していたことを確認できた。そして、この培養系は、Fig. 4-1(A) のような二段階培養のモデルケースであった。一般に、代謝の移行過程には、4 時間程度かかると知られる (Kim *et al.*, 2011, Zhou *et al.*, 2012)。この移行過程を解析することを念頭に 30 分程度の時間スケールで解析可能な系の構築を試みた。そのために、標識時間が 10 分程度であることが示さる中間代謝産物の ^{13}C 濃縮度を用いたフラックス解析法を開発した。そして、代謝フラックスの状態が変化していく培養系を 30 分間隔での連続的なスナップショットとして観測することに成功した。Fig. 4-1 (A) の移行期は 4 時間前後であるため、30 分間隔で代謝状態のスナップショットを可能とする 3 章の解析系を適用することで、これまで不明とされてきた代謝状態の遷移を明らかにできる。従って、IM を利用した代謝フラックス解析は、流加培養の増殖期、移行期、物質生産期の全てを適用範囲にできると評価する。

以上に述べたように FAA と IM 適用範囲が分かった。ここで、どちらの手法がより優れているかということに触れる。従来法である PAA、FAA、そして、IM を利用した解析の特徴を Table 4-1 に示した。この Table から分かるように、従来法である PAA は適用範囲が限定的であるのに対して、FAA と IM にはそれほど大差がなく、優劣は一概に決められない。1 章などでも述べたが、共に異なる利点を持っている。2 章で触れた FAA は、標識時間は最も短いわけではないが、IM よりも高含量であり、分析が容易に行える。また、従来法でも利用されきた GC-MS を利用できるため、簡便に実験系を構築できる利点がある。3 章で触れた IM は、細胞内の蓄積量が最も少ないために、CE-MS などによる測定で検出下限値以下となる恐れがある。しかし、標識時間は最も短く、その適用範囲は他の ^{13}C 代謝産物の中で最も広い。従って、単純に優劣は決められない。ただし、使える場面について言及するのであれば、両方の手法が使える場合では簡便な FAA、標識時間の短さが求められる場合では IM を使用することが、実験を適切かつ効率的に行えるものとする。

(A)



(B)

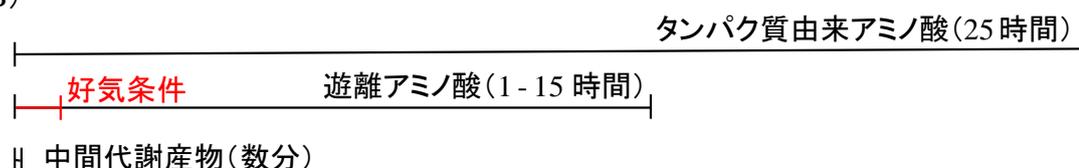


Fig. 4-1 好氣的流加培養による物質生産の模式図と代謝産物の標識時間

(A) の代謝変化は、先行研究における好氣的な物質生産を参考にしてしている。括弧内は、解析可能な手法である。(B) は、今回の実験条件における各代謝産物の標識時間である。(A) の横軸と縮尺を一致させている。ただし、(A) と (B) の実験条件は異なるため、実際には (B) の時間スケールはいくらかずれる。

Table 4-1 各 ^{13}C 代謝産物の特徴

扱った章	代謝産物	標識時間	実験誤差	流加培養		
				増殖期	移行期	物質生産期
2章	タンパク質由来アミノ酸(従来法)	25 時間	○	○	×	×
2章	遊離アミノ酸	1 - 15 時間	○	○	×	○
3章	中間代謝産物	数分	△	○	○	○

増殖期などの培養時間は Fig. 4-1 (A) を参照

4-3 展望

大腸菌を用いた物質生産プロセスとして、多くの場合、流加培養が適用される。流加培養では、基質の追加、菌体の希釈を目的として適宜、培地が培養槽に追加され、目的物質は常に代謝状態が変化する中で生産される。この一例として、1,3-propanediol、フェニルアラニンなどの生産がある。そして、一般に、基質の添加量、添加するタイミングは、菌体の代謝状態の変化とそれに要する時間に影響を及ぼす。限られた時間内で菌体の物質生産性を高めるにはこのような培養条件の検討は必須と言える。また、3章での実験のように、薬剤を添加することで培養挙動を変化させ、目的物質を生産させる流加培養プロセスもある。微生物自身が代謝反応の生体触媒として働いているため、培養前半では微生物の増殖活性を最大化して、菌体量をできるだけ上昇させる。その後、標的物質生産経路の活性を上昇させるという戦略がとられる。このような物質生産プロセスにおいては、基質だけではなく、薬剤添加のタイミングと量も、その後の菌体の物質生産性を大きく左右する。本研究の3章で確立した中間代謝産物を利用した解析手法は、代謝が変化している状態においても適用可能であることを述べた。これにより、細胞の代謝状態を短時間で解析し、代謝経路の最適制御方策を確立することが可能になると考えられる。また、代謝状態の遷移だけでなく、物質生産期の代謝状態を解析することも重要である。上述の高菌体濃度を活かした物質生産期では、低菌体濃度のときよりも反応時間を短くできるため、雑菌汚染のリスクを小さくできる利点を持つ。

本研究において、2章で得られた結果より、FAAの ^{13}C 標識情報を利用することで、全ての培養系（回分培養系、流加培養系、連続培養系）に対して代謝フラックス決定が可能となった。ただし、その必要条件として、(1) FAAが測定できること（実験装置に依存する検出範囲にサンプルを濃縮できること）、(2) 代謝フラックスが定常状態にあるタイムスケールは、培養細胞の酸素比消費速度から推定される標識時間よりも長い必要があること（Fig. 4-2）、(3) ^{13}C 濃縮度が定常状態にあると仮定できること、(4) 物質の合成と消費がバランスし、代謝状態が一定にあると仮定できること、(5) グルコースを単一炭素源としていること、(6) 菌体の比増殖速度が0.2 [h]付近であること、が挙げられる。また、3章で得られた結果から、IMを利用できる場合には、代謝変化が生じる全ての代謝現象に対して、代謝フラックスを決定できる解析系を構築できたと考える。ただし、その必要条件として、(1) 解糖系、TCAサイクル、そして、ペントースリン酸経路に関わるIMを測定できること（実験装置に依存する検出範囲にサンプルを濃縮できること）、(2) 代謝変化を追従するのであれば、制御される遺伝子の発現量変化のタイムスケールよりも、代謝解析の時間間隔が短いこと、(3) 標識時間が代謝変化のタイムスケールよりも短く、 ^{13}C 濃縮度が定常状態にあると仮定できること、(4) 物質の合成と消費がバランスし、代謝状態が一定にあると仮定できること、(5) グルコースを単一炭素源としていること、(6) 菌体の比増殖速度が0.2 [h]付近であること、

が挙げられる。従来法（PAA を利用した測定法）では、 ^{13}C 濃縮度が定常に達するまでに数十時間を要するが、その間の代謝状態の変化が ^{13}C 濃縮度に影響を与える問題があった。上述の FAA や IM を利用することで、この問題を克服することが可能となったため、代謝が変化する培養系であっても適用できると結論付けられる。従って、これらの必要条件を満たすことで、他の培養系へ今回の結果を還元できるものとする。

最後に、細胞状態は遺伝子の発現量のみならず、酸素濃度、pH、栄養源濃度など環境条件に依存して大きく変化する。様々な条件において、標的物質の生産量を所与の時間内に最大化するためには、菌体構築と発酵槽の運転法を考慮する必要がある。つまり、どのような代謝経路を有する細胞を構築することが最も望ましいか、いつどの程度の基質や薬剤を添加するのが最適であるのかといった発酵槽の運転法を考慮する必要がある。このような発酵槽の運転法と微生物の分子育種戦略を有機的に発展させるためにも、代謝状態を解析できる手法の確立は微生物生産プロセス設計にとって今後ますます必要となるものとする。

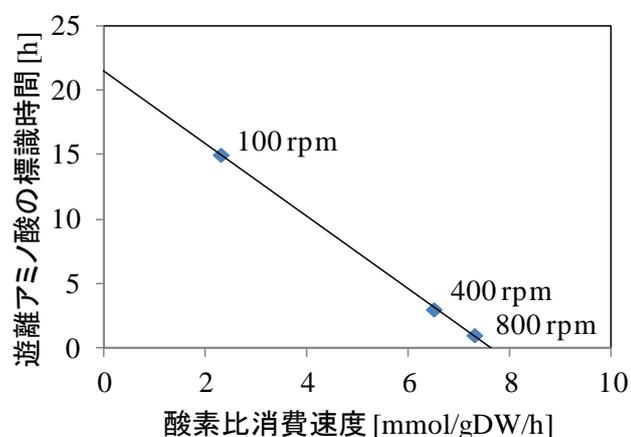


Fig. 4-2 酸素比消費速度と遊離アミノ酸の標識時間

各攪拌回転数における遊離アミノ酸の標識時間は、Fig. 2-13 (E) より求められた。そのとき、800 rpm の標識開始 1 時間後の遊離アミノ酸の ^{13}C 濃縮度と、同攪拌回転数の標識 25 時間後のタンパク質由来アミノ酸の ^{13}C 濃縮度の相関係数を閾値とした。酸素比消費速度は、Fig. 2-9 の値を使用した。実線は、最小二乗法に基づいて引いた。

参考文献

Alexeeva, S., Hellingwerf, K. J., Teixeira de Mattos, M. J., Requirement of *ArcA* for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *J. Bacteriol.* 2003, 185, 204-9.

Antoniewicz, M. R., Kraynie, D. F., Laffend, L. A., González-Lergier, J. *et al.*, Metabolic flux analysis in a nonstationary system: fed-batch fermentation of a high yielding strain of *E. coli* producing 1,3-propanediol. *Metab. Eng.* 2007, 9, 277-92.

Atsumi, S., Hanai, T., Liao, J. C., Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* 2008, 451, 86–89.

Berríos-Rivera, S. J., Sánchez, A. M., Bennett, G. N., San, K. Y., Effect of different levels of NADH availability on metabolite distribution in *Escherichia coli* fermentation in minimal and complex media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 65, 426-32.

Chassagnole, C., Noisommit-Rizzi, N., Schmid, J. W., Mauch, K., *et al.*, Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 2002, 79, 53-73.

Chaves, Das, Neves, H. J., Vasconcelos, A. M., Capillary gas chromatography of amino acids, including asparagine and glutamine: sensitive gas chromatographic-mass spectrometric and selected ion monitoring gas chromatographic-mass spectrometric detection of the N,O(S)-tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr.* 1987, 392, 249-58.

Chen, X., Alonso, A. P., Allen, D. K., Reed, J. L. *et al.*, Synergy between ¹³C-metabolic flux analysis and flux balance analysis for understanding metabolic adaptation to anaerobiosis in *E. coli*. *Metab. Eng.* 2011, 13, 38-48.

Christensen, B., Nielsen, J., Isotopomer analysis using GC-MS. *Metab. Eng.* 1999, 1, 282-90.

Costenoble, R., Müller, D., Barl, T., van Gulik, W. M., ¹³C-Labeled metabolic flux analysis of a fed-batch culture of elutriated *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2007, 7, 511-26.

Dauner, M., Sauer, U., GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 642-9.

De, Graaf A. A., Striegel, K., Wittig, R. M., Laufer, B. *et al.*, Metabolic state of *Zymomonas mobilis* in glucose-, fructose-, and xylose-fed continuous cultures as analysed by ¹³C- and ³¹P-NMR spectroscopy. *Arch. Microbiol.* 1999, 171, 371-85.

Feist, A. M., Henry, C. S., Reed, J. L., Krummenacker, M. *et al.*, A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.* 2007, 3, 121.

Follstad, B. D., Balcarcel, R. R., Stephanopoulos, G., Wang, D. I., Metabolic flux analysis of hybridoma continuous culture steady state multiplicity. *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 63, 675-83.

Gerigk, M. R., Maass, D., Kreutzer, A., Sprenger, G. *et al.*, Enhanced pilot-scale fed-batch L-phenylalanine production with recombinant *Escherichia coli* by fully integrated reactive extraction. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2002, 25, 43-52.

Granström, T., Aristidou, A. A., Leisola, M., Metabolic flux analysis of *Candida tropicalis* growing on xylose in an oxygen-limited chemostat. *Metab. Eng.* 2002, 4, 248-56.

Grotkjaer, T., Akesson, M., Christensen, B., Gombert, A. K., *et al.*, Impact of transamination reactions and protein turnover on labeling dynamics in (¹³C)-labeling experiments. *Biotechnol. Bioeng.* 2004, 86, 209-16.

Hirao, T., Nakano, T., Azuma, T., Sugimoto, M. *et al.*, L-Lysine production in continuous culture of an L-lysine hyperproducing mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1989, 32, 269-273.

Hua, Q., Yang, C., Baba, T., Mori, H. *et al.*, Responses of the central metabolism in *Escherichia coli* to phosphoglucose isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase knockouts. *J. Bacteriol.* 2003, 185, 7053-67.

Ingraham, J. L., Maaløe, O., Neidhardt, F. C., Growth of the bacterial cell, Sinauer Associates Inc., 1983.

Iwatani, S., Van, Dien, S., Shimbo, K., Kubota, K. *et al.*, Determination of metabolic flux changes during fed-batch cultivation from measurements of intracellular amino acids by LC-MS/MS. *J. Biotechnol.* 2007, 128, 93-111.

Jojima, T., Fujii, M., Mori, E., Inui, M. *et al.*, Engineering of sugar metabolism of *Corynebacterium glutamicum* for production of amino acid L-alanine under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 87, 159-65.

Kim, J., Hirasawa, T., Saito, M., Furusawa, C., *et al.*, Investigation of phosphorylation status of OdhI protein during penicillin- and Tween 40-triggered glutamate overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 91, 143-51.

Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., *et al.*, Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of E. coli K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.* 2005, 12, 291-9.

Komatsubara, S., Kisumi, M., Chibata, I., Participation of lysine-sensitive aspartokinase in threonine production by S-2-aminoethyl cysteine-resistant mutants of *Serratia marcescens*. *Appl Environ Microbiol.* 1979, 38, 777-82.

Krömer, J. O., Sorgenfrei, O., Klopprogge, K., Heinzle, E. *et al.*, In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. *J. Bacteriol.* 2004, 186, 1769-84.

Lee, J., Goel, A., Ataai, M. M., Domach, M. M., Flux adaptations of citrate synthase-deficient *Escherichia coli*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994, 745, 35-50.

Li, M., Ho, P.Y., Yao, S., Shimizu, K., Effect of *lpdA* gene knockout on the metabolism in *Escherichia coli* based on enzyme activities, intracellular metabolite concentrations and metabolic flux analysis by ¹³C-labeling experiments. *J. Biotechnol.* 2006, 122, 254-66.

Madigan, T. M., Martinko, M. J., Parker, J., Brock Biology of Microorganisms, 2000. 室伏きみ子, 関啓子 (監訳), Brock 微生物学, 株式会社オーム社, 2003.

- Mawhinney, T. P., Robinett, R. S., Atalay, A., Madson, M. A., Analysis of amino acids as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1986, 358, 231-42.
- McKinlay, J. B., Shachar-Hill, Y., Zeikus, J. G., Vieille, C., Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of ¹³C-labeled metabolic product isotopomers. *Metab. Eng.* 2007, 9, 177-92.
- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Schaechter, M., Physiology of the bacterial cell, Sinauer Associates Inc., 1990.
- Nissen, T. L., Schulze, U., Nielsen, J., Villadsen, J., Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 1997, 143, 203-18.
- Nöh, K., Grönke, K., Luo, B., Takors, R. *et al.*, Metabolic flux analysis at ultra short time scale: isotopically non-stationary ¹³C labeling experiments. *J. Biotechnol.* 2007, 129, 249-67.
- Nöh, K., Wiechert, W., The benefits of being transient: isotope-based metabolic flux analysis at the short time scale. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 91, 1247-65.
- Ohashi, Y., Hirayama, A., Ishikawa, T., Nakamura, S. *et al.*, Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS. *Mol. Biosyst.* 2008, 4, 135-47.
- Okamoto, K., Kino, K., Ikeda, M., Hyperproduction of L-threonine by an *Escherichia coli* mutant with impaired L-threonine uptake. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997, 61, 1877-1882.
- Peng, L., Arauzo-Bravo, M. J., Shimizu, K., Metabolic flux analysis for a ppc mutant *Escherichia coli* based on ¹³C-labelling experiments together with enzyme activity assays and intracellular metabolite measurements. *FEMS Microbiol Lett.* 2004, 235, 17-23.
- Roscher, A., Kruger, N. J., Ratcliffe, R. G., Strategies for metabolic flux analysis in plants using isotope labeling. *J. Biotechnol.* 2000, 77, 81-102.
- Rosman, K. J. R., Taylor, P. D. P., Isotopic composition of the elements. *Pure. Appl. Chem.* 1998, 70, 217-231.

- Shiio, I., Otsuka, S., Takahashi, M., Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *J. Biochem.* 1962, *51*, 56-62.
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Bailey, J. E., Hochuli, M. *et al.*, Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nat. Biotechnol.* 1997, *15*, 448-52.
- Schmidt, K., Carlsen, M., Nielsen, J., Villadsen, J., Modeling isotopomer distributions in biochemical networks using isotopomer mapping matrices. *Biotechnol. Bioeng.* 1997, *55*, 831-40.
- Shen, C. R., Lan, E. I., Dekishima, Y., Baez, A. *et al.*, Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, *77*, 2905-15.
- Shirai, T., Fujimura, K., Furusawa, C., Nagahisa, K. *et al.*, Study on roles of anaplerotic pathways in glutamate overproduction of *Corynebacterium glutamicum* by metabolic flux analysis. *Microb. Cell. Fact.* 2007, 6-19.
- Shirai, T., Matsuzaki, K., Kuzumoto, M., Nagahisa, K. *et al.*, Precise metabolic flux analysis of coryneform bacteria by gas chromatography-mass spectrometry and verification by nuclear magnetic resonance. *J. Biosci. Bioeng.* 2006, *102*, 413-24.
- Shirai, T., Nakato, A., Izutani, N., Nagahisa, K. *et al.*, Comparative study of flux redistribution of metabolic pathway in glutamate production by two coryneform bacteria. *Metab. Eng.* 2005, *7*, 59-69.
- Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., *et al.*, Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2002, *74*, 2233-9.
- Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., Nielsen J., *Metabolic engineering*. Academic Press, 1998. 清水浩, 塩谷捨明 (訳), 代謝工学, 東京電機大学出版局, 2002.
- Syed, A. N., Jiangfeng, Z., Pei, Y. H., Kazuyuki, S., Effects of *arcA* and *arcB* genes knockout on the metabolism in *Escherichia coli* under aerobic condition. *Biochem. Eng. J.* 2009, *44*, 240-250.

Szyperski, T., Biosynthetically directed fractional ¹³C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur. J Biochem.* 1995, 232, 433-48.

Taymaz-Nikerel, H., de, Mey, M., Ras, C., ten, Pierick, A. *et al.*, Development and application of a differential method for reliable metabolome analysis in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 2009, 386, 9-19.

Toya, Y., Ishii, N., Nakahigashi, K., Hirasawa, T. *et al.*, ¹³C-metabolic flux analysis for batch culture of *Escherichia coli* and its *Pyk* and *Pgi* gene knockout mutants based on mass isotopomer distribution of intracellular metabolites. *Biotechnol. Prog.* 2010, 26, 975-92.

Toya, Y., Nakahigashi, K., Tomita, M., Shimizu, K. Metabolic regulation analysis of wild-type and *arcA* mutant *Escherichia coli* under nitrate conditions using different levels of omics data. *Mol Biosyst.* 2012, 8, 2593-604.

Usui, Y., Hirasawa, T., Furusawa, C., Shirai, T. *et al.*, Investigating the effects of perturbations to *pgi* and *eno* gene expression on central carbon metabolism in *Escherichia coli* using (¹³)C metabolic flux analysis. *Microb. Cell Fact.* 2012, 11-87.

Vallino, J. J., Stephanopoulos, G., Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, 41, 633-46.

van Winden, W., Schipper, D., Verheijen, P., Heijnen, J., Innovations in generation and analysis of 2D [(¹³)C,(¹)H] COSY NMR spectra for metabolic flux analysis purposes. *Metab. Eng.* 2001, 3, 322-43.

van Winden, W. A., van Dam, J. C., Ras, C., Kleijn, R. J., Metabolic-flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D based on mass isotopomer measurements of (¹³)C-labeled primary metabolites. *FEMS Yeast Res.* 2005, 5, 559-68.

Varma, A., Palsson, B. O., Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60, 3724-31.

Wahl, A., El, Massaoudi, M., Schipper, D., Wiechert, W. *et al.*, Serial ¹³C-based flux analysis of an L-phenylalanine-producing *E. coli* strain using the sensor reactor. *Biotechnol. Prog.* 2004, 20, 706-14.

Winder, C. L., Dunn, W. B., Schuler, S., Broadhurst, D. *et al.*, Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites. *Anal. Chem.* 2008, 80, 2939-48.

Wise, W. S., The measurement of the aeration of culture media. *J. Gen. Microbiol.* 1951, 5, 167-77.

Zamboni, N., Fischer, E., Muffler, A., Wyss, M. *et al.*, Transient expression and flux changes during a shift from high to low riboflavin production in continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 2005, 89, 219-32.

Zhou, Y., Ma, X., Hou, Z., Xue, X. *et al.*, High cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* for prodrug of recombinant human GLPs production. *Protein Expr. Purif.* 2012, 85, 38-43.

今堀和知. 山川民夫（編集者）., 生化学辞典, 東京化学同人, 2002 年出版, 823-824 頁.

Appendix

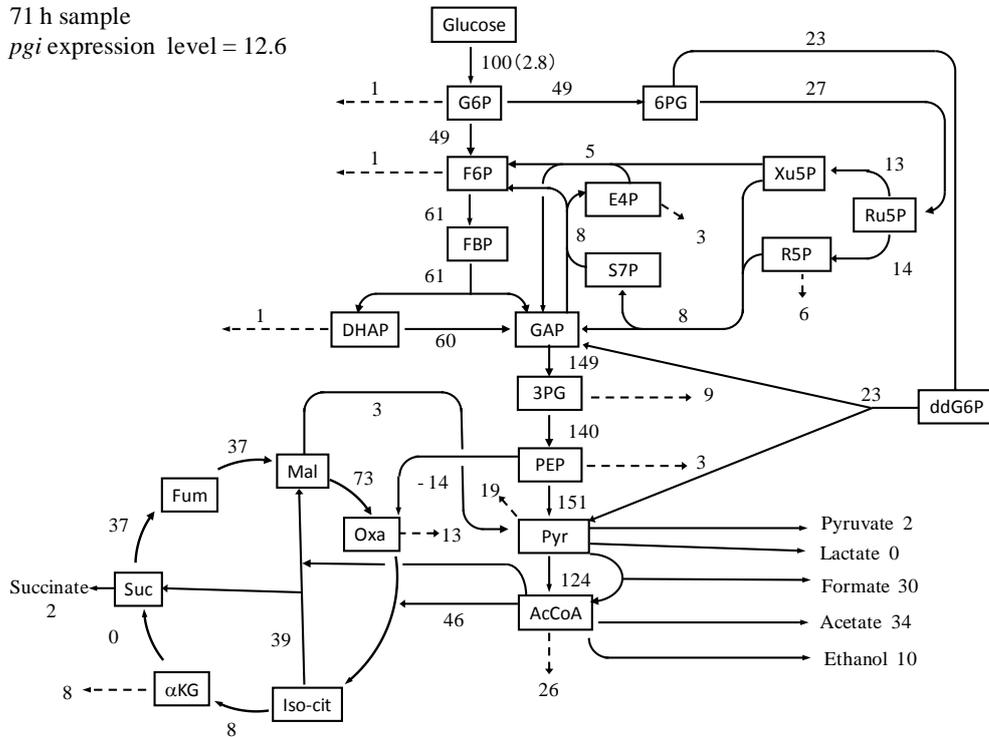
本論文で用いた略語

- 2PG : 2-ホスホグリセリン酸 (2-phosphoglycerate)
3PG : 3-ホスホグリセリン酸 (3-phosphoglycerate)
6PGDH : 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (6-phosphogluconate dehydrogenase)
6PGL : 6-ホスホグルコノ-1,5-ラクトン (6-phosphogluconolactone)
6PG : 6-ホスホグルコン酸 (6-phosphogluconate)
ACK : 酢酸キナーゼ (acetate kinase)
ADH : アルコールデヒドロゲナーゼ (alcohol dehydrogenase)
ATP : アデノシン三リン酸 (adenosine 5'-triphosphate)
AcCoA : アセチル-CoA (acetyl-coenzymeA)
Ace : 酢酸 (acetate)
BPG : 1,3-ビスホスホグリセリン酸 (1,3-bisphosphoglycerate)
Cit : クエン酸 (citrate)
DHAP : ジヒドロキシアセトンリン酸 (dihydroxyacetone phosphate)
E4P : エリトロース-4-リン酸 (erythrose-4-phosphate)
ED経路 : エントナー・ドウドロフ経路 (Entner-Doudoroff pathway)
F6P : フルクトース-6-リン酸 (fructose-6-phosphate)
FAA : 遊離アミノ酸 (Free Amino Acids)
FBP : フルクトース-1,6-ビスリン酸 (fructose-1,6-bisphosphate)
FUM : フマル酸ヒドラターゼ (fumarate hydratase)
Fum : フマル酸 (fumarate)
G6PDH : グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (glucose-6-phosphate dehydrogenase)
G6P : グルコース-6-リン酸 (glucose-6-phosphate)
GAP : グリセルアルデヒド-3-リン酸 (glyceraldehyde-3-phosphate)
ICDH : イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (Isocitrate dehydrogenase)
IM : 中間代謝産物 (Intermediate metabolite)
IPTG : イソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)
IsoCit : イソクエン酸 (isocitrate)
IsoCit : イソクエン酸 (Isocitric acid)
LDH : 乳酸デヒドロゲナーゼ (lactate dehydrogenase)
Lac : 乳酸 (lactate)

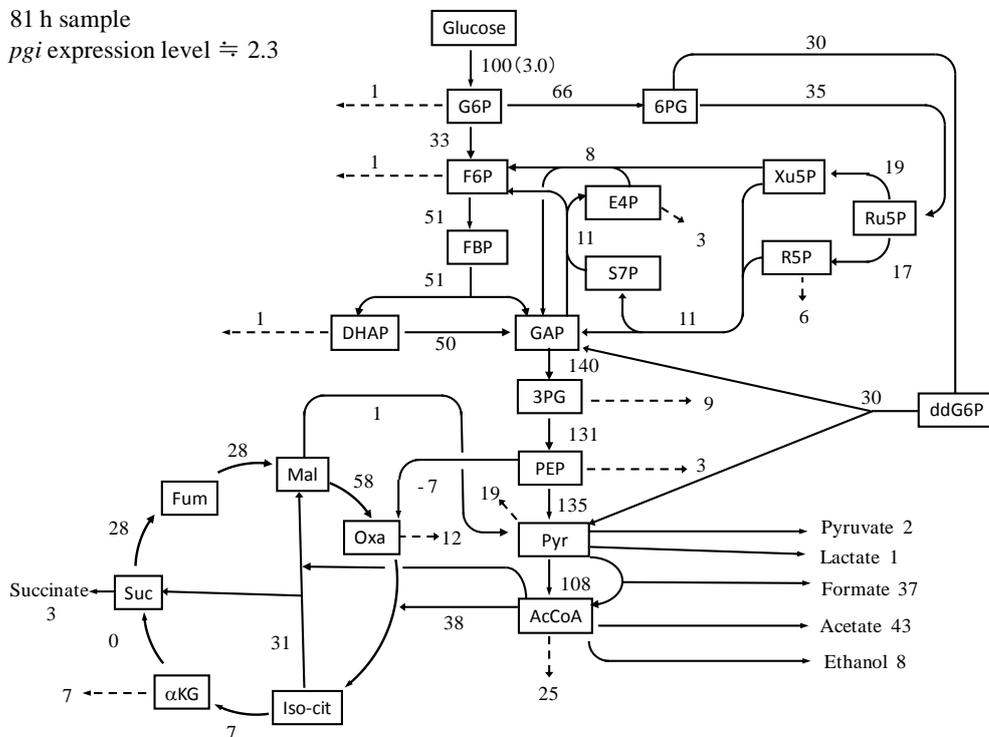
MDH : リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (malate dehydrogenase)
MDH : リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (malate dehydrogenase)
Mal : リンゴ酸 (malate)
MeOH : メタノール (methanol)
NADH : 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide)
NADPH : 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NADP : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NAD : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide)
Oxa : オキサロ酢酸 (Oxaloacetic acid)
PAA : タンパク質由来アミノ酸 (Proteinogenic Amino Acid)
PCK : ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (phosphoenolpyruvate carboxykinase)
PEP : ホスホエノールピルビン酸 (phosphoenolpyruvate)
PFL : ピルビン酸ギ酸リアーゼ (pyruvate formate lyase)
pgi : ホスホグルコース異性化酵素 (phosphoglucose isomerase)
PPP : ペントースリン酸経路 (Pentose Phosphate Pathway)
PTA : ホスホトランスアセチラーゼ (phosphotransacetylase)
PYK : ピルビン酸キナーゼ (pyruvate kinase)
Pyr : ピルビン酸 (pyruvate)
R5P : リボース-5-リン酸 (ribose-5-phosphate)
Ru5P : リブロース-5-リン酸 (ribulose-5-phosphate)
S7P : セドヘプツロース (Sedoheptulose 7-phosphate)
SDH : コハク酸デヒドロゲナーゼ (succinate dehydrogenase)
Suc : コハク酸 (succinate)
TCAサイクル : トリカルボン酸サイクル (tricarboxylic acid cycle)
Xu5P : キシルロース-5-リン酸 (Xylulose 5-phosphate)
aKG : ニオキソグルタル酸 (α -ketoglutaric acid)

代謝フラックス分布

71 h sample
pgi expression level = 12.6

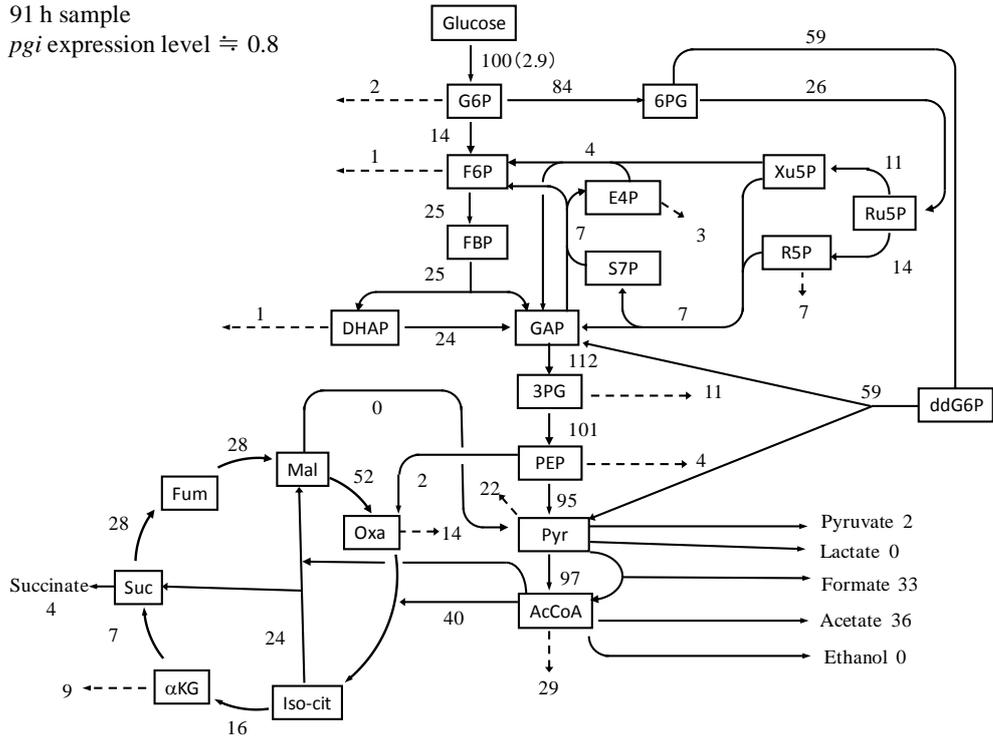


81 h sample
pgi expression level \div 2.3

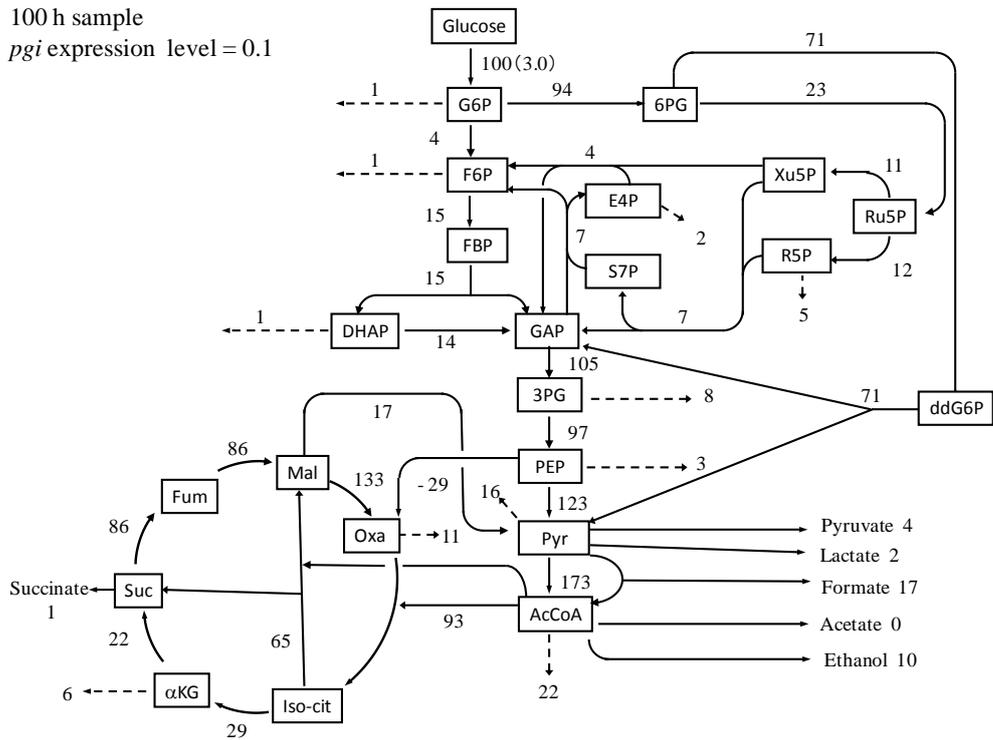


培養 71、81 時間の菌体の代謝フラックス解析結果である。各値はグルコースの取り込み量を 100 としたときの相対値であり、括弧内のグルコースの値は実測値である。

91 h sample
pgi expression level ≈ 0.8



100 h sample
pgi expression level = 0.1



培養 71、81 時間の菌体の代謝フラックス解析結果である。各値はグルコースの取り込み量を 100 としたときの相対値であり、括弧内のグルコースの値は実測値である。

実測 ^{13}C 濃縮度と推定 ^{13}C 濃縮度 (3章 培養 60 時間後サンプル)

Name	Select	Mesure	Estimate
FBP338	0	0.049	0.080
	1	0.102	0.098
	1	0.096	0.094
	1	0.300	0.283
	1	0.179	0.161
	1	0.095	0.098
	1	0.180	0.185
DHAP168	1	0.297	0.289
	1	0.182	0.168
	1	0.095	0.111
PGA184	1	0.426	0.432
	1	0.271	0.274
	1	0.186	0.176
	1	0.121	0.129
PEP166	1	0.421	0.421
	1	0.257	0.260
	1	0.187	0.184
	1	0.142	0.145
Ru5P229	1	0.414	0.410
	1	0.158	0.142
	1	0.086	0.130
	1	0.199	0.171
	1	0.250	0.217
R5P229	1	0.111	0.147
	1	0.197	0.194
	1	0.124	0.142
	1	0.123	0.130
	1	0.183	0.171
	1	0.223	0.217
S7P289	1	0.137	0.147
	1	0.210	0.194
	0	0.004	0.006
	1	0.036	0.064
	1	0.096	0.125
	1	0.203	0.168
	1	0.205	0.217
IsoCit191	1	0.195	0.195
	1	0.127	0.148
	1	0.135	0.078
	1	0.031	0.027
	1	0.069	0.066
	1	0.182	0.170
	1	0.214	0.219
	1	0.275	0.263
Mal133	1	0.148	0.149
	1	0.243	0.245
	1	0.202	0.198
	1	0.087	0.089
Fum115	1	0.091	0.089
	1	0.169	0.149
	1	0.301	0.319
	1	0.237	0.245
	1	0.201	0.198

中間代謝産物の名前の後ろの数値は、その代謝産物の質量 (M) を表しており、それ以降は別の物質となるまで M+1、M+2...と続く。Select は代謝フラックス解析に使用したかどうかを表しており、1 の場合は使用したことを意味する。Measure は ^{13}C 濃縮度の実測値、Estimate は代謝フラックス分布が決定したときの ^{13}C 濃縮度推定値である。

謝辞

博士後期課程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に入学し、本研究論文を書くに至りました。その過程において多くの方々のご協力を賜りましたことをここに心より厚く御礼申し上げます。

研究の場を与えて下さり、また、辛抱強く、始終暖かくご指導、ご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の清水浩教授に心より御礼申し上げます。博士論文審査員として、有益なご指導、ご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、若宮直紀教授、四方哲也教授、前田太郎教授、古澤力招へい教授に心より感謝申し上げます。博士課程のアドバイザー委員として有益なご指導、ご助言を頂きました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻の馬場健史准教授に心より感謝申し上げます。特に研究の遂行にあたり、常に熱く語りかけ、研究の何たるかをご指導頂きました代謝情報工学講座の古澤力元准教授（現招へい教授、理化学研究所生命システム研究センター多階層生命動態研究チームチームリーダー）に心より御礼申し上げます。研究の考察や雑誌会において常に鋭いご指摘を頂きました代謝情報工学講座の松田史生准教授に心より御礼申し上げます。リアルタイム RT-PCR を始めとする分子生物学実験、考察、また研究生生活においても様々なご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御礼申し上げます。情報解析に関する問いに常に気さくに答えて頂きました代謝情報工学講座の小野直亮元特任准教授（現奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科システム情報学領域計算システムズ生物学研究室助教）に御礼申し上げます。常に学生に寄り添う人柄で様々な相談に乗って頂きました代謝情報工学講座の吉川勝徳特任助教に心から御礼申し上げます。代謝フラックス解析やメタボローム解析に関する多くの相談に乗って頂きました代謝情報工学講座の戸谷吉博特任助教に御礼申し上げます。代謝情報工学講座の博士課程修了者にあたり、研究面、私生活において兄のように親身に相談に乗って頂き、大阪大学大学院情報科への進学のきっかけを下さった元三井化学の白井智量博士（現理化学研究所バイオマス工学研究プログラム細胞生産研究チーム上級研究員）に御礼申し上げます。博士課程から在籍して研究面、生活面においてご指導、相談に乗って下さり、見習うべき先輩とさせて頂きました堀之内貴明博士（現理化学研究所生命システム研究センター多階層生命動態研究チーム特別研究員）に御礼申し上げます。本実験に使用する実験材料を構築して頂いた梶畠秀一修士（代謝情報工学講座博士課程）、および臼井佑希修士に御礼申し上げます。そして、研究活動や研究生生活においてお世話になった研究室の皆様にも心より厚く御礼申し上げます。

最後に、安らげる時間を提供してくれた友人たち、長い学生生活を見守って頂き、精神的、経済的に支えて下さった家族に心より感謝致します。