

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

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

# 遊離アミノ酸および中間代謝物質の <sup>13</sup>C 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 <sup>13</sup>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

 <u>Eiji Mori</u>, Chikara Furusawa, Shuichi Kajihata, Tomokazu Shirai, Hiroshi Shimizu, "Evaluating <sup>13</sup>C enrichment data of free amino acids for precise metabolic flux analysis", Biotechnology Jouarnal, 6, 1377 – 1387 (2011) (博士論文第2章)

### 国際会議

<u>Eiji Mori</u>, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu, "Metabolic flux analysis on <sup>13</sup>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] <u>Eiji Mori</u>, 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] <u>森 英詞</u>, 古澤 力, 清水 浩, "遊離アミノ酸の<sup>13</sup>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] <u>森 英詞</u>, 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<sup>13</sup>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, <u>森 英詞</u>, 梶畠 秀一, 古澤 力, 清水 浩, "中間代謝産物の<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>C 標識を開始後、経時的に菌体を回収し、タンパク質由来アミノ酸と遊離アミノ酸サンプ ルを調製した。アミノ酸の<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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 <sup>13</sup>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	<b>駿の <sup>13</sup>C 標識時間の解析</b>	.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	<sup>13</sup> C標識実験	14
2-2-4 サン	イプ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	重成分の測定	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	オフラックス解析	20
2 - 2 - 7 - 1	<sup>13</sup> C 濃縮度の算出	20
2 - 2 - 7 - 2	<sup>13</sup> 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 <sup>13</sup> 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 <sup>13</sup> C 標識実験	53
3-2-4 サンプ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 <sup>13</sup> 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 pgi 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 pgi 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7	7
4-1 結果のまとめ7	7
4-2 得られた知見の寄与するところ7	78
4-3 展望8	31
参考文献	33
Appendix	<del>)</del> 0
本論文で用いた略語	<del>)</del> 0
代謝フラックス分布	92
実測 <sup>13</sup> C 濃縮度と推定 <sup>13</sup> C 濃縮度(3 章 培養 60 時間後サンプル)	<b>)</b> 4
新辞	)5

# 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 生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き、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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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 種までは行なっていないものの、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<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>C グルコースなどによって標識される <sup>13</sup>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性がある。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

<sup>13</sup> C標識される物質	細胞内蓄積量 [µmol/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<sup>13</sup>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。

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

(式 1-1)

ここで、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 を表す。また、I<sub>x</sub>[無単位] は、細胞内物質 x の <sup>13</sup>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 <sup>13</sup>C 濃縮度を表している。C<sub>y</sub> [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<sub>v</sub>、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 μ [/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<sup>13</sup>C代謝産物のある時点における<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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、 Table1-1 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。

$$\begin{split} \frac{d(I_{IM})}{dt} &= \frac{r}{C_{IM}}(I_{Glc} - I_{IM}) - \frac{F}{V}I_{IM} \\ &( \not \eqsim 1-2) \\ \frac{d(I_{IM})}{dt} &= \frac{r}{C_{IM}}(I_{Glc} - I_{IM}) - \mu I_{IM} \end{split}$$

$$\frac{\mathrm{d}(\mathrm{I}_{\mathrm{FAA}})}{\mathrm{d}t} = \frac{\mathrm{r}}{\mathrm{C}_{\mathrm{FAA}}}(\mathrm{I}_{\mathrm{IM}} - \mathrm{I}_{\mathrm{FAA}}) - \mu \mathrm{I}_{\mathrm{FAA}}$$

(式 1-3)

(式1-4)

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





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 ーとなる。また、I [無単位] は、細胞内物質の<sup>13</sup>C 濃縮度を意味しており、I<sub>Gle、</sub>I<sub>IM</sub>、I<sub>FAA</sub>、 I<sub>PAA</sub> 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 <sup>13</sup>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<sub>IM</sub>、C<sub>FAA</sub>、C<sub>PAA</sub> 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<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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されている。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<sup>13</sup>C 代謝フラックス解析は、代謝産物の<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>C標識炭素源として与えた。そして、遊離アミノ酸の<sup>13</sup>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<sup>13</sup>C 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<sup>13</sup>C 標識時間の解析

# 2-1 緒言

代謝フラックス解析は一般に、<sup>13</sup>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、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<sup>13</sup>C 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、<sup>13</sup>C 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はなく、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、 <sup>13</sup>C 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<sup>13</sup>C 濃縮度のダイナミクスを解析した。また、FAA の<sup>13</sup>C 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<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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 X 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、 0.5 g/L NaCl、2 g/L NH<sub>4</sub>Cl、123 mg/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、2.78 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、14.7 mg/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、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 ℃、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 OD<sub>600</sub> = 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<sup>-1</sup>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 ジャーファーメンター 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

13

# 2-2-3-3 <sup>13</sup>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<sup>13</sup>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-<sup>13</sup>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<sup>13</sup>Cを含む M9 培地を<sup>13</sup>C培地、1-<sup>13</sup>C グルコースのことを<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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℃、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℃、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℃、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℃ 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疏水層、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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用 い、0.8 mL/min の流速で送液した。サンプル注入量は 20  $\mu$ l とし、カラムはカラムオー ブンを用いて 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 ℃ で2分間保持し、10 ℃/min で 150 ℃ 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ァーメンターの酸素移動 容量係数(K<sub>1</sub>a)に基づいて算出した。

K<sub>L</sub>a 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)。

$$\ln \frac{C^* - C_{\rm ini}}{C^* - C_{\rm L}} = K_{\rm L}a \times t$$

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。

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

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  $\mu$ m; 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  $\mu$ l 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 (M302) 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いおり、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 <sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>C で標識されることにより質量数 M、M+1、M+2、・・・、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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>Cによる標識情報を持つ。その標識情報は 各同位異性体に由来する。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<sup>13</sup>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 <sup>13</sup>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<sup>13</sup>C 標識基質に由来する<sup>13</sup>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	М	M+1	M+2	M+3
	Н	0.999885	0.000115		
	С	0.9893	0.0107		
	Ν	0.99632	0.00368		
	0	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 m0、m1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<sup>13</sup>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 まで存在する。この存在割合を m0、m1、m2、・・・、m7 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、

$$MDV corr = \begin{bmatrix} m_0 \\ m_1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

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。 $^{l}H$  と  $^{2}H$  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

	$p_H^2$	0	0	0	0	0	0	ן 0	
	$2p_Hq_H$	$p_H^{\ 2}$	0	0	0	0	0	0	
	$q_H^2$	$2p_Hq_H$	$p_H^{\ 2}$	0	0	0	0	0	
СМ —	0	$q_H^2$	$2p_Hq_H$	$p_H^2$	0	0	0	0	
$CM_H =$	0	0	$q_H^2$	$2p_Hq_H$	$p_H^{\ 2}$	0	0	0	
	0	0	0	$q_H^2$	$2p_Hq_H$	$p_H^{\ 2}$	0	0	
	0	0	0	0	$q_H^2$	$2p_Hq_H$	$p_H^{\ 2}$	0	
	LO	0	0	0	0	$q_H^2$	$2p_Hq_H$	$p_H^2$	
									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<sub>0</sub>、q<sub>0</sub>、そして s<sub>0</sub>とする場合、補正行列 CM<sub>0</sub>は以下のようになる。

 $CM_O =$ 

ſ	$p_0^2$	0	0	0	0	0	0	0 ]	
	$2p_0q_0$	$p_o^{\ 2}$	0	0	0	0	0	0	
	$q_0^2 + 2p_0 s_0$	$2p_0q_0$	$p_o^{\ 2}$	0	0	0	0	0	
	$2q_0s_0$	$q_0^2 + 2p_0 s_0$	$2p_0q_0$	$p_o^{\ 2}$	0	0	0	0	
	$S_0^2$	$2q_0s_0$	$q_0^2 + 2p_0 s_0$	$2p_0q_0$	$p_o^{\ 2}$	0	0	0	
	0	$s_0^2$	$2q_0s_0$	$q_0^2 + 2p_0 s_0$	$2p_0q_0$	$p_o^{\ 2}$	0	0	
	0	0	$S_0^2$	$2q_0s_0$	$q_0^2 + 2p_0 s_0$	$2p_0q_0$	p	0	
	0	0	0	$s_0^2$	$2q_0s_0$	$q_0^2 + 2p_0 s_0$	$2p_0q_0$	$p_0^{2}$	
							-	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。  

$$MDVrow = CM_H \times CM_0 \times MDVcorr$$

式 2-9

従って、MDVcorr について書き直すと式 2-10 となる。
$$MDVcorr = CM_{H}^{-1} \times CM_{O}^{-1} \times MDVrow$$

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。  

$$MDV corr = CM_{H}^{-1} \times CM_{O}^{-1} \times CM_{Si}^{-1} \times CM_{N}^{-1} \times MDV row$$

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。

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	$6PG \rightarrow Ru5P + CO2$	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。

<sup>13</sup>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、 $r_{synthesis} \ge r_{consumption}$ 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<sup>13</sup>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<sub>i</sub>)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)。

$$RSS = \sum \left\{ \frac{MDV_{sim} - MDV_{exp}}{MDV_{sim}} \right\}^{2}$$

式 2-13

ここで MDV<sub>sim</sub> は代謝フラックスから推定される MDV、MDV<sub>exp</sub> 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<sub>i</sub>を与えなおし、残差二乗和が十分に小さくなったとき、r<sub>i</sub>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。


 $r13 \times (IMM_{Pyr \rightarrow AcCoA} \times IDV_{Pyr}) - r14 \times IDV_{AcCoA} = 0$ 

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、IMM<sub>Pyr=>AcCoA</sub>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<sup>13</sup>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、好気的な条件では 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、嫌気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 1 mol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、嫌気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、その生育環境が好気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 <sup>13</sup>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<sup>13</sup>C 濃縮度経時変化

<sup>13</sup>C 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 FAA<sup>13</sup>C 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<sup>13</sup>C 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 が変化するのかはこれまでに議論されていない。そこで、本研究では<sup>13</sup>C 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、<sup>13</sup>C 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<sup>13</sup>C 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、<sup>13</sup>C 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<sup>13</sup>C 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。<sup>13</sup>C 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<sup>13</sup>C 濃縮 度が定常に達する 25 時間後まで培養を行った。

<sup>13</sup>C グルコース添加直後からの <sup>13</sup>C 標識同位体が取り込まれた(M+1、M+2、・・・、 M+n)、もしくは <sup>13</sup>C 標識同位体が取り込まれていないていない(M)、PAA と FAA の <sup>13</sup>C 濃縮度のダイナミクスを Fig. 2-11 と 12 に示した。PAA と FAA の <sup>13</sup>C 濃縮度の M、 M+1 等の成分の値は <sup>13</sup>C 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 <sup>13</sup>C 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 PAA<sup>13</sup>C 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、FAA<sup>13</sup>C 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。

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

式 2-14

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

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<sub>FAA</sub>の<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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。

<sup>13</sup>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-<sup>13</sup>C グルコースがペントースリン酸経路のリブロース 5-リン酸に変 換されるとき、1位に標識された<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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 <sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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<sup>13</sup>C 濃縮度は 高い相関を持った(Fig. 2-13(A)-(C))。ここで、PAA<sup>13</sup>C濃縮度は<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>Cグルコースを単一炭素源にした<sup>13</sup>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 (Grotkiacer et al., 2004、 Iwtani et al., 2007)。しかし、PAAの<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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 <sup>13</sup>C 培地交換後からのタンパク質由来アミノ酸 <sup>13</sup>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 <sup>13</sup>C 数を意味し、それぞれ0個(M)、1個(M+1)、2個(M+2)の <sup>13</sup>C を含む。



Fig. 2-12 <sup>13</sup>C 培地交換後からの遊離アミノ酸 <sup>13</sup>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 <sup>13</sup>C 数を 意味し、それぞれ0個(M)、1個(M+1)、2個(M+2)の <sup>13</sup>C を含む。



Fig. 2-13 タンパク質由来アミノ酸<sup>13</sup>C 濃縮度と遊離アミノ酸<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>C 濃縮度の散布図であり、遊離アミノ酸の<sup>13</sup>C 濃縮度は<sup>13</sup>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<sup>13</sup>C 濃縮度の散布図であり、遊離アミノ酸の<sup>13</sup>C 濃縮度は<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>C 基質添加後の時間における FAA<sup>13</sup>C 濃縮度と PAA<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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FAA<sup>13</sup>C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、<sup>13</sup>C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。 FAA<sup>13</sup>C 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、<sup>13</sup>C 培地へ切り換え1時間後の FAA<sup>13</sup>C 濃縮度は、切り換え 25 時 間後から得られた PAA の<sup>13</sup>C 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<sup>13</sup>C 培地への交換後、25 時間後の PAA の<sup>13</sup>C 濃縮度と任意の時点における FAA の <sup>13</sup>C 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、FAA<sup>13</sup>C濃縮度が PAA<sup>13</sup>C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<sup>13</sup>C 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 <sup>13</sup>C 濃縮度は <sup>13</sup>C 培地へ 交換後 25 時間の値に固定した一方、FAA の<sup>13</sup>C 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、FAA<sup>13</sup>C 濃縮度が定常に至ると同時に、培養 25 時間目の PAA<sup>13</sup>C 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、<sup>13</sup>C 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<sup>13</sup>C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、<sup>13</sup>C 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、FAA<sup>13</sup>C 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<sup>13</sup>C濃縮度を解析した (式 2-16)。I<sub>FAA</sub>と I<sub>IM</sub> はそれぞれ、FAA<sup>13</sup>C 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。rinとrout 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、CFAA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。

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

式 2-17

ここで  $C_{FAA}/r_{in} = B$  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、<sup>13</sup>C 成分 I<sub>FAA</sub> は時定数 B において I<sub>IM</sub> へ収束する。この式では 上流代謝産物の<sup>13</sup>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-<sup>13</sup>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<sup>13</sup>C濃縮度の要素 Mを使用した。FAAの800 rpm においては、<sup>13</sup>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 <sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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 <sup>13</sup>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、およそ妥当な結果となった。これは実際の蓄積量がおよそ文献 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

<sup>13</sup>C 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 FAA<sup>13</sup>C 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<sup>13</sup>C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<sup>13</sup>C 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、<sup>13</sup>C 培地へ交換 25 時間後の PAA の<sup>13</sup>C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<sup>13</sup>C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、<sup>13</sup>C 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。

$$\left| \sum_{i} \left( f_{i}^{\text{pro}} - f_{i}^{\text{free}} \right)^{2} \right|$$

式 2-18

ここで、 $f_i^{pro} \geq f_i^{free}$ 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、<sup>13</sup>C 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 <sup>13</sup>C 培地に交換後 25 時間に得られる値で評価した。FAA<sup>13</sup>C 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、<sup>13</sup>C 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、<sup>13</sup>C 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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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 異なる撹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) <sup>13</sup>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、左から撹 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 異なる撹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) <sup>13</sup>C 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、左から撹拌回転数 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 箇所に位置する。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 <sup>13</sup>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<sup>13</sup>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撹拌回転数 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、<sup>13</sup>C グルコースを添加してからの両者の<sup>13</sup>C 標識情報を<sup>13</sup>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撹拌回転数を 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<sup>13</sup>C 濃縮度のダイナミクスを追った。その結果、PAA<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>C 濃縮 度が定常に至る培養後 25 時間と同等の<sup>13</sup>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等であった。そして、これらの <sup>13</sup>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のかと示唆された。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<sup>13</sup>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 点で従来法と同等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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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、絶対的な時間で見た場合、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  $\beta$ -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<sup>13</sup>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)	$lacl^{4}$ rrnB3 $\Delta lacZ4787$ hsdR514 $\Delta (araBAD)$ 567	
	⊿(rhaBAD)568 rph-1	
YUEC00 (control strain)	BW25113pFE604	
YUEC04	BW25113⊿pgi::kan-pFE604-pgi	
JW3985	BW25113 <i>Apgi::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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、 3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5 g/L NaCl、2 g/L NH<sub>4</sub>Cl、123 mg/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、2.78 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、 14.7 mg/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>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 ℃ 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1Lジャーファーメンター 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 $0.2 \text{ h}^{-1}$ で行った。

前培養液を OD<sub>600</sub> = 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 ーメンターに植菌し、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 <sup>13</sup>C 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<sup>13</sup>C グルコースを含む培地へと切り換えた。このとき用いた<sup>13</sup>C 標識グルコースは、 1-<sup>13</sup>C グルコースと U-<sup>13</sup>C 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(<sup>13</sup>C 基質投入より、5 滞留時間後)、<sup>13</sup>C 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、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リ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<sup>13</sup>C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。

サンプリングは、<sup>13</sup>C 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 <sup>13</sup>C 培地に切り換え ることで pgi 発現量の変化がはじまるであろう 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 <sup>13</sup>C 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量するにあたり、そのときの菌体量は菌体濃度(OD<sub>600</sub>)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 μmの フィルターを用いて瞬時に吸引ろ過し、10 mLの Milli-O 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2mL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 µM 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×g、4℃、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疏水層、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 ×g、4 ℃、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℃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 µM 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 ℃、15000 rpm、1 min)した後、液体窒素で急冷し、RNA 実験まで-80 ℃ 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 <sup>13</sup>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<sup>13</sup>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

ある時間点のサンプルから測定された中間代謝産物の、<sup>13</sup>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。<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sub>600</sub>) 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<sub>600</sub> 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<sup>-16</sup> L と 2.8×10

### 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<sup>7</sup> 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 µl 加え、撹拌した後 (10 sec.)、室温で 10 分間インキュベートした。 この間 2 分毎に撹拌を行った。次に添付のマニュアルに従って、RNeasy Mini Kit (QIAGEN、Germaney)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  $\mu$ l の 5×PrimeScript Buffer (for Real Time)、1  $\mu$ l の PrimeScript RT Enzyme Mix I、1  $\mu$ l の Random 6 mers (100  $\mu$ M)、800 ng の RNA、そして、RNase free water を全量が 20  $\mu$ 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 °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 °C で 5 秒間インキュベートすることで逆転写反応を行った。サンプルは使用まで-80 °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 *NdeI* 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 µl の各サンプル、10 µl の Fast SYBR Green Master Mix (2×)、0.4 µl の Forward Primer (10 pmol/µl)、0.4 µl の Reverse Primer (10 pmol/µl)、7.2 µl 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 °C で 30 秒間の伸長反応、95 °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。

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	$Oxa \rightarrow PEP + CO2$	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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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 <sup>13</sup>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、<sup>13</sup>C 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。





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 [/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で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し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。





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。

$$\frac{d(C_{B} \times IDV_{B})}{dt} = r1 \times (IMM_{A \to B} \times IDV_{A}) - r2 \times IDV_{B} = 0$$

$$\vec{x} 3-1$$

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



 $\frac{\mathrm{d}(\mathrm{C}_{\mathrm{B}} \times \mathrm{IDV}_{\mathrm{B}})}{\mathrm{d}t} = \mathrm{r1} \times (\mathrm{IMM}_{\mathrm{A} \to \mathrm{B}} \times \mathrm{IDV}_{\mathrm{A}}) - \mathrm{r2} \times \mathrm{IDV}_{\mathrm{B}} = 0$ 

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 の定量を行なっており、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 (µmol/L) から乾燥菌体重量あたりの絶対量 である µmol/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 4.96×10<sup>-16</sup> L と 2.8×10<sup>-13</sup> 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。

$$\frac{\mathrm{dC}_{\mathrm{B}}}{\mathrm{dt}} = \mathrm{r1} - \mathrm{r2} = 0$$

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 µmol/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 µmol/gDW/h に対して最大で 5 µmol/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)。

 $\frac{\mathrm{dC}_{\mathrm{G6P}}}{\mathrm{dt}}(\mathrm{IDV}_{\mathrm{G6P}}) = 0$ 

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 Apgi 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、菌体あたりの物質量を表している。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	流人フフックスに対する蓄積フフックスの割合	

	Time				
Reaction	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 + CO2	2.1%	2.1%	1.0%	0.5%	
aKG> Suc + CO2	-	-	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 + CO2> Oxa	-1.1%	-2.1%	7.4%	-0.5%	
Mal> Pyr + CO2	6.3%	15.2%	-	0.9%	
G6P> 6PG	0.3%	0.2%	-	0.2%	
E6PG> Ru5P + CO2	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 µmol/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

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

式 3-2

$$\frac{d (IDV_B)}{dt} = \frac{r_1}{C_B} \left( (IMM_{A \to B} \times IDV_A) - IDV_B \right) = 0$$

$$\vec{x} 3-5$$

ここで、rとCは定数であり、変数は IDV<sub>A</sub>と IDV<sub>B</sub>である。従って、IDV<sub>B</sub>の変化がな いことを満たす解は、IMM<sub>A→B</sub>×IDV<sub>A</sub>と IDV<sub>B</sub>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<sup>13</sup>C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 *Apgi* 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、*Apgi* 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、Apgi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、より嫌気的なほど多 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、相対的に嫌気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。

71



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。



◆ G6P --> F6P ■ G6P --> 6PG

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<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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、好気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<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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考える。



Fig. 4-1 好気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気的な物質生産を参考にしている。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<sup>13</sup>C 代謝産物の特徴

				流加培養		
扱った章	代謝産物	標識時間	実験誤差	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	0	0	×	$\times$
2章	遊離アミノ酸	1 - 15 時間	0	0	$\times$	0
3章	中間代謝産物	数分	$\Delta$	0	0	0

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<sup>13</sup>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)<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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考える。

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 要となるものと考える。



Fig. 4-2 酸素比消費速度と遊離アミノ酸の標識時間

各撹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<sup>13</sup>C 濃縮度と、同撹拌回転数 の標識 25 時間後のタンパク質由来アミノ酸の<sup>13</sup>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 (13)C-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 (13)C-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 premeability 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: グリセルアルデヒト-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-1thiogalactopyranoside) 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 ade-nine dinucleotide)

NADPH:還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (nicotina-13 mide adenine dinucleotide phosphate)

NADP: ニュチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (nicotinamide ade-nine dinucleotide phosphate)

NAD: ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine di-nucleotide)

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: 二オキソグルタル酸(α-ketoglutaric acid)

# 代謝フラックス分布



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。



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。

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
	1	0.426	0.432
PGA184	1	0.271	0.274
	1	0.186	0.176
	1	0.121	0.129
	1	0.421	0.421
PEP166	1	0.257	0.260
	1	0.187	0.184
	1	0.142	0.145
	1	0.414	0.410
Ru5P229	1	0.158	0.142
	1	0.086	0.130
	1	0.199	0.171
	1	0.250	0.217
	1	0.111	0.147
	1	0 1 9 7	0 1 9 4
R5P229	1	0 1 2 4	0 1 4 2
	1	0 1 2 3	0 1 3 0
	1	0.183	0.171
	1	0.223	0.217
	1	0.137	0.147
	1	0.107	0 1 9 4
S7P289	0	0.004	0.006
0/1 200	1	0.036	0.064
	1	0.000	0.004
	1	0.000	0.120
	1	0.205	0.100
	1	0.205	0.217
	1	0.195	0.135
	1	0.127	0.140
IsoCit101	1	0.133	0.070
130010131	1	0.001	0.027
	1	0.000	0.000
	1	0.102	0.170
	1	0.214	0.219
	1	0.2/0	0.203
	1	0.148	0.10/
	1	0.082	0.090

実測 <sup>13</sup> C 濃縮度と推定 <sup>13</sup> C 濃縮度(3 章	<sup>1</sup> 培養 60 時間後サンプル)
---	-----------------------------

Name	Select	Mesure	Estimate
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
Mal133	1	0.087	0.089
	1	0.148	0.149
	1	0.320	0.319
	1	0.243	0.245
	1	0.202	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 <sup>13</sup>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 <sup>13</sup>C 濃縮度推定値であある。

## 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 アドバイザリ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、研究活動や研究生活においてお世話になった研 究室の皆様に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。