



Title	シアノバクテリアの代謝フラックス解析法の開発と異なる栄養条件におけるSynechocystis sp. PCC 6803の代謝解析
Author(s)	仲嶋, 翼
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52017
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

シアノバクテリアの
代謝フラックス解析法の開発と
異なる栄養条件における
Synechocystis sp. PCC 6803 の代謝解析

提出先 大阪大学大学院情報科学研究科

提出年月 2015 年 1 月

仲 嶋 翼

学位取得に関わる発表論文

学術雑誌

[1] Tsubasa Nakajima, Shuichi Kajihata, Katsunori Yoshikawa, Fumio Matsuda, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa, and Hiroshi Shimizu, “Integrated metabolic flux and omics analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under mixotrophic and photoheterotrophic conditions”, *Plant and Cell Physiology*, 55 (9), 1605-1612, 2014 (博士論文第 2 章)

国際会議

[1] Tsubasa Nakajima, Shuichi Kajihata, Yuta Kojima, Katsunori Yoshikawa, Takashi Hirasawa, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu, “Effect of a photosynthesis inhibitor on metabolic flux profile of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803”, *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress*, 11521, Hokkaido Japan, Sep. 2011 (博士論文第 2 章)

[2] Tsubasa Nakajima, Shuichi Kajihata, Katsunori Yoshikawa, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu, “Metabolic flux analysis of cyanobacteria on various trophic conditions”, *Metabolic Engineering IX*, 29, Biarritz France, Jun. 2012 (博士論文第 3 章)

内容梗概

シアノバクテリアを用いて、光合成により CO_2 から有用物質を生産するプロセスが、持続可能性の高さから期待されている。従来のバイオプロダクションである、植物性バイオマスから微生物の発酵機能により有用化合物を生産するプロセスと比較して、本プロセスは、太陽光エネルギーの利用効率が高い、 CO_2 を直接基質とできる、土地選択の制約が小さいといった多くの長所を有している。一方で、その生産性はいまだに低く、生産速度だけでなく生産収率も大きな向上の余地を残している。細胞が炭素源をより効率的に目的物質に変換するには、細胞内の代謝状態を最適化する必要がある。そのためには培養環境に応じて細胞が代謝をどのように変化させるのかを把握し、適切な制御や改変を加えなければならない。シアノバクテリアは光合成により CO_2 を単一炭素源として生育する光独立栄養条件のほか、糖を単一炭素源として生育する従属栄養条件、 CO_2 と糖を併せて利用する混合栄養条件など、多様な栄養条件における生育が可能である。また、栄養源を制限した培養条件により、増殖を阻害し目的物質の生産収率を高める方法も物質生産に用いられる。このような様々な栄養条件においてシアノバクテリアの代謝の流れを明らかにすることは、物質生産へ向けた代謝改変戦略立案のために重要な基礎をなすと考えられる。本研究では、モデル生物である *Synechocystis* sp. PCC 6803 について、代謝フラックス解析により異なる栄養条件下における代謝フラックス分布を明らかにすることを目的とした。シアノバクテリアに適用できる代謝フラックス解析法を開発し、 ^{13}C 標識 glucose を用いた手法と、 ^{13}C 標識 CO_2 を用いた解析を実施可能にした。さらに解析結果から、代謝制御メカニズムの推定や、物質生産に向けてどのような代謝改変戦略が有効かを考察することを目指した。

本学位論文は第 1 章から第 5 章により構成される。

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、 ^{13}C 標識 glucose を用いた *Synechocystis* の代謝フラックス解析法を開発した。従属栄養条件と混合栄養条件に代謝フラックス解析を適用し、2 条件間において大きく代謝フラックス分布が変化したことを明らかにした。物質生産収率の向上には、 CO_2 排出を伴う酸化的ペントースリン酸経路の代謝フラックスを低減することが重要と考えられた。また代謝フラックス解析結果をメタボローム分析およびトランスクリプトーム分析結果と比較することで、代謝経路のフラックス変化は必ずしも対応する代謝酵素の遺伝子発現量変化によるものではないことが分かった。2 条件間における、中央代謝系内の大規模な代謝フラックス分布の変化は、一部の遺伝子発現量変化によって生じたと推測された。

第 3 章では、これまで構築されていなかった ^{13}C 標識 CO_2 を用いた代謝フラックス解析法を開発し、光独立栄養条件における *Synechocystis* の代謝フラックス分布を解析し

た. CO_2 を単一炭素源として生育する条件の代謝フラックス分布が明らかとなり, 物質生産にとって理想的な代謝フラックス分布との比較を行った. 光独立栄養条件で物質の生産収率を高めるには, CO_2 固定を行うカルビンサイクルと目的物質生産経路の炭素フロー比の調節, および CO_2 排出経路や菌体構成成分の合成経路といった炭素のロスにつながる競合経路の削減が重要であることが見出された. さらに, ^{13}C 標識実験において捉えた, 代謝物質の ^{13}C 標識パターンから代謝反応のキネティクスについて考察し, 代謝反応の律速点を部分的に絞り込むことができた.

第4章では, 窒素制限条件における *Synechocystis* の代謝フラックス分布を初めて明らかにした. 窒素制限条件は, 菌体合成を阻害し目的物質の収率を高める目的で物質生産に用いられる培養条件である. 本研究では, 代謝フラックス解析を適用するために *Synechocystis* の硝酸トランスポータ破壊株を用いた窒素制限系を構築し, 窒素が制限されていない野生株と代謝フラックス分布の差を比較した. 窒素制限下では, 増殖速度の低下に対して相対的に CO_2 取り込みフラックスが大きくなったため, 余剰の炭素を glycogen や CO_2 として排出したと考えられる. 物質生産にはこのような炭素排出経路の代謝フラックスを低下させ, 目的物質の前駆体を合成する経路に炭素をより分配する工夫が必要となる.

第5章では本研究で得られた知見をまとめ, 代謝フラックスに着目してシアノバクテリアの工学的育種について述べた.

目次

1章 緒論.....	1
1-1 シアノバクテリアを用いた有用物質生産.....	1
1-2 異なる栄養条件での代謝の制御.....	3
1-3 代謝フラックス解析.....	4
1-4 本論文の目的と構成.....	8
2章 ¹³ C 標識 glucose を用いた混合栄養条件, 従属栄養条件の解析.....	10
2-1 緒言.....	10
2-2 実験材料と実験方法.....	12
2-2-1 使用菌株.....	12
2-2-2 使用培地.....	12
2-2-3 培養操作.....	13
2-2-4 測定項目と測定方法.....	13
2-2-4-1 光強度.....	13
2-2-4-2 glucose 濃度.....	13
2-2-4-3 <i>gap1</i> 遺伝子発現量.....	14
2-2-5 代謝フラックス解析.....	14
2-2-5-1 解析原理概要.....	14
2-2-5-2 代謝経路の数理モデル化.....	15
2-2-5-3 GC-MS によるアミノ酸の ¹³ C 標識パターンの分析.....	24
2-2-5-4 マススペクトルからの MDV の算出.....	26
2-2-5-5 初期菌体量の補正.....	27
2-2-5-6 天然同位体比の補正.....	28
2-2-5-7 代謝反応モデル.....	29
2-2-5-8 バイオマス合成フラックスの算出.....	30
2-2-5-9 代謝フラックス解析のアルゴリズム.....	31
2-2-5-10 代謝フラックスの 95%信頼区間算出.....	32
2-2-5-11 使用したアプリケーション.....	33
2-2-6 メタボローム分析.....	33
2-2-7 トランスクリプトーム解析.....	34
2-3 結果と考察.....	35
2-3-1 glucose の ¹³ C 標識パターンの選択.....	35
2-3-2 培養結果.....	37
2-3-3 ¹³ C 標識パターンの測定と代謝フラックスの算出.....	38
2-3-4 混合栄養条件および従属栄養条件での代謝フラックス分布.....	40

2-3-5	代謝フラックス解析による不確かな代謝経路の検証	41
2-3-6	物質生産収率向上に向けた考察	42
2-3-7	代謝フラックスとメタボローム, トランスクリプトームの統合解析	43
2-4	結言	48
3章	¹³ C 標識 CO ₂ を用いた光独立栄養条件の解析	50
3-1	緒言	50
3-2	実験材料と実験方法	52
3-2-1	同位体的非定常状態における代謝フラックス解析	52
3-2-1-1	解析原理	52
3-2-1-2	動的な ¹³ C 標識過程のモデル化	53
3-2-1-3	¹³ C 標識パターンの経時変化シミュレーション	54
3-2-1-4	代謝物質のプール量の扱い	54
3-2-1-5	天然同位体比の補正方法	54
3-2-1-6	代謝モデル	55
3-2-1-7	バイオマス合成フラックスの算出	56
3-2-1-8	代謝フラックス算出のアルゴリズム	57
3-2-2	培養操作	59
3-2-3	¹³ C 標識実験	59
3-2-4	サンプリング手法	60
3-2-4-1	サンプリング概要	60
3-2-4-2	GC-MS 分析用サンプルの取得方法	61
3-2-4-3	CE-MS および LC-MS/MS 分析用サンプルの取得方法	61
3-2-5	GC-MS 分析による中間代謝物質の ¹³ C 標識パターンの分析	62
3-2-5-1	サンプル調製	62
3-2-5-2	誘導體化	62
3-2-5-3	分析	63
3-2-6	LC-MS/MS 分析による中間代謝物質の ¹³ C 標識パターンの分析	63
3-2-6-1	サンプル調製	63
3-2-6-2	分析	63
3-2-7	CE-MS 分析による細胞内代謝物質プール量の定量	64
3-3	結果と考察	65
3-3-1	培養結果	65
3-3-2	¹³ C 標識パターンの測定結果	66
3-3-3	代謝物質プール量の測定結果	72
3-3-4	代謝フラックス分布とプール量のフィッティング	73
3-3-5	光独立栄養条件における代謝フラックス分布	77

3-3-6	代謝反応のキネティクスについての考察	78
3-3-7	光独立栄養条件の物質生産に向けた考察	80
3-4	結言	84
4章	窒素制限条件での代謝解析	86
4-1	緒言	86
4-2	実験材料と実験方法	88
4-2-1	$\Delta nrtABCD$ 株の作成	88
4-2-1-1	$nrtABCD$ 破壊用コンストラクトの作成	88
4-2-1-2	<i>Synechocystis</i> の形質転換	88
4-2-1-3	<i>Synechocystis</i> のゲノム DNA 抽出	89
4-2-1-4	PCR による $nrtABCD$ 破壊の確認	89
4-2-2	測定項目と測定方法	89
4-2-2-1	glycogen 蓄積量	89
4-2-2-2	乾燥菌体重量	90
4-2-2-3	吸収スペクトル	90
4-2-3	フラスコ培養	90
4-2-4	フォトバイオリアクターによる培養	90
4-2-5	代謝フラックス解析	91
4-2-5-1	^{13}C 標識実験	91
4-2-5-2	^{13}C 標識パターン (MDV) の分析	91
4-2-5-3	代謝モデル	92
4-2-5-4	バイオマス合成フラックスの算出	93
4-2-5-5	EMU による ^{13}C 標識過程の表現	93
4-2-5-6	^{13}C 標識パターンの経時変化シミュレーション	93
4-2-5-7	フィッティングのアルゴリズム	94
4-3	結果と考察	96
4-3-1	Δnrt の構築	96
4-3-2	Δnrt の増殖の硝酸濃度依存性	96
4-3-3	フォトバイオリアクターを用いた培養による表現型の解析	98
4-3-4	^{13}C 標識実験による代謝フラックスの解析	101
4-3-4-1	培養の再現性	101
4-3-4-2	代謝物質プール量の測定結果	103
4-3-4-3	^{13}C 標識パターンの測定結果	105
4-3-4-4	代謝フラックス分布の算出	111
4-3-4-5	窒素制限条件における代謝フラックス分布の変化	115
4-3-4-6	物質生産に向けた考察	120

4-4 結言.....	123
5章 結論.....	124
5-1 結果のまとめ.....	124
5-2 シアノバクテリアの ^{13}C 代謝フラックス解析.....	126
5-3 代謝フラックスに着目したシアノバクテリアの育種.....	128
参考文献.....	133
付録.....	142
本論文で用いた略語.....	151

1章 緒論

1-1 シアノバクテリアを用いた有用物質生産

CO₂排出量の削減や化石資源の有限性が問題となるなか、持続可能な物質・エネルギー生産システムを構築することが社会的な要請となっている。1つのアプローチとして微生物を用いたバイオプロダクションが提案され、これまで盛んに研究されてきた (Stephanopoulos, 2007)。これは一般的には、植物性バイオマスを微生物の発酵機能により有用化合物に変換するというものである。植物が固定した CO₂ を使用するため化石資源を使用する場合と比べて総 CO₂ 排出量が少なくなる点、化学的プロセスに比べて穏和な反応工程をとることができる点などのメリットが挙げられる。微生物を用いた物質生産は古くは発酵食品の生産に使用され、近代では ethanol 生産や acetone-butanol 発酵技術などが発展し、現在は多くの有用物質が生産されている。化石資源を基点として燃料や素材を合成するオイルリファイナリーに対して、それらを微生物による物質生産で将来的に置き換えるバイオリファイナリーという構想も立ち上がっている (Octave and Thomas, 2009)。バイオプロセスによる生産物質の種類を増やすと同時に、目的物質の生産性向上を狙う育種研究がこれまでに行われてきた。微生物育種の古典的な手法は有用種を環境中から取得する、変異処理後にスクリーニングするといった方法であるが、昨今では遺伝子工学的に細胞の機能を改変する手法も用いられる。その結果、生産性向上に向けた育種研究において、遺伝子の強発現や遺伝子破壊、異種生物の遺伝子導入、酵素機能の改変などの手法が良く取られる。また一方で微生物の生産能力を高める工夫と同時に、木質バイオマスの利用や有機廃棄物からの物質生産など、基質の選択も含めたプロセスの設計も検討されている (Shi *et al.*, 2009 ; Sims *et al.*, 2010)。可食性バイオマスは食糧需要との競合が懸念され耕作適地も限れるなか、このような視点はバイオリファイナリーを社会システムに組み込む上で重要である。

この動きにあって、さらに一歩進んだバイオプロセスとしてシアノバクテリアを用いた物質生産が注目されている (Satyanarayana *et al.*, 2011)。シアノバクテリアとは、植物と同じ酸素発生型の光合成を行う細菌を指す。従来のバイオプロダクションにおいて、植物による CO₂ 固定と微生物を用いた発酵変換の 2 段階に分けていた工程を、シアノバクテリアを用いた場合は 1 ステップで完結させられる。また、植物が太陽光エネルギーを捉えてバイオマス合成に変換できる効率は 3%以下に留まるが、シアノバクテリアの効率はそれよりも高いことが知られ (3-9%)、太陽光エネルギーの利用効率を飛躍させられる (Ducat *et al.*, 2011)。本プロセスでは CO₂ を直接基質とするため食糧需要と競合せず、工場排ガスなどから CO₂ を安定供給できる利点もある。培養に耕作不適地や水域も利用可能で土地制約が少なく、また水域を利用できればスケールアップも容易である。以上のことからシアノバクテリアを用いた物質生産は潜在的効率が高く、従来のバ

イオプロダクションの欠点を持たない理想的なプロセスと考えられている。現在、国内外で実用化に向けた研究が行われているが、化石資源の枯渇や CO₂ ガスの排出問題が深刻に捉えられるなかで、実用化に向けた取り組みは今後も加速していくと予想される。研究内容としては培養系の検討や、有用種の取得も盛んに行われているが、従来のバイオプロダクションに見られたようにシアノバクテリアも遺伝子工学的な手法を用いた育種研究が試みられている (Wang *et al.*, 2012)。それに伴い、シアノバクテリアが天然に合成する脂質や糖といった高分子物質、色素等だけでなく、細胞が本来生産しない有用化合物の生産へと可能性が広がってきた。このような試みには遺伝子操作系が確立されている *Synechocystis* 属や *Synechococcus* 属といったモデル生物が良く用いられ、アルコール、アルデヒド、オレフィン、テルペン類、有機酸、糖などの生産が報告されている (Table 1-1)。新たな目的物質の産生可能性が模索されると同時に、それらの生産性のさらなる向上を目指して細胞の改変が積極的に行われている (Gudmundsson and Nogales, 2015)。

細胞の物質生産性を高める方策は大別すると次の 3 点に区分することができる。(1) 光合成の速度を高める；最大 10% 程度である光エネルギーの利用効率を高める戦略や、シアノバクテリアにおいて律速反応といわれる CO₂ 固定反応の速度を向上させる研究など、(2) 細胞の頑健性を高める；よりストレスに強く、高い生産性を長時間維持できる細胞や培養系の確立、(3) 細胞内の炭素フローを改変し目的物質の収率を高める研究、に分けられる。(3) の収率の向上に関せば、先行研究では 2,3-butanediol 生産収率は理論最大収率の 50% であり、同様に isobutyraldehyde 生産収率は 36%、ethylene は 19%、lactate は 11%、isoprene は 1% と概算されている (Oliver and Atsumi, 2014)。ethanol のように理論最大収率の 90% 以上の生産収率に達した物質もあるが、シアノバクテリアによる生産対象化合物の多くは、数倍から数百倍に収率を高める余地がある。そこで、取り込んだ炭素をより効率的に目的物質に変換させるように代謝システムを制御しなければならない。

なお真核藻類を用いるバイオプロセスがシアノバクテリア同様考案されているが、真核藻類は遺伝子操作系が十分構築されていない場合が多く、さらに天然に蓄積する糖や脂質が生産対象とされる場合が多い (Wang *et al.*, 2012)。本研究では合成生物学的手法が整備されており、生産可能な化合物が多岐にわたるシアノバクテリアに焦点を当てる。

Table 1-1 シアノバクテリアを用いて生産が報告された有用化合物.

生産化合物	使用生物	文献	
アルコール	ethanol	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Gao <i>et al.</i> , 2012
	isopropanol	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	Kusakabe <i>et al.</i> , 2013
	isobutanol	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Varman <i>et al.</i> , 2012
	2,3-butanediol	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Savakis <i>et al.</i> , 2013
	1-butanol	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	Lan <i>et al.</i> , 2012
アルデヒド	isobutyraldehyde	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	Atsumi <i>et al.</i> , 2009
オレフィン	ethylene	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Guerrero <i>et al.</i> , 2012
テルペン類	isoprene	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Lindberg <i>et al.</i> , 2010
	limonene	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	Davies <i>et al.</i> , 2014
有機酸	lactate	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Angermayr <i>et al.</i> , 2014
糖	sucrose	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	Ducat <i>et al.</i> , 2012
	glycogen	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	Aikawa <i>et al.</i> , 2014

1-2 異なる栄養条件での代謝の制御

細胞は代謝を制御してさまざまな環境下で生存している。代謝とは細胞が外部の有機物や無機物からエネルギーを獲得して、生理機能を維持し、細胞の構成成分を合成する過程を指す。通常は、細胞はおかれた栄養条件下で自身の増殖に利するように代謝状態を調節する。逆に言えば、増殖に有利な代謝状態を維持できた細胞が集団内で多勢を占めるようになる。有用物質生産プロセスでは、目的物質の生産は細胞の利益につながらない場合が多く、細胞増殖と物質生産収率の向上は同時には成り立ちにくい。そこで、細胞がどのような代謝状態を取るかを把握し、目的物質の生産収率を向上させるように代謝を人為的に改変する必要がある。

細胞は様々な栄養条件で生育可能であり、各条件で細胞増殖に適した代謝状態は異なる。光合成を行うシアノバクテリアは、そのほかのバクテリアには見られない独自の代謝モードを有している (Smith, 1983)。例えば、モデル生物である *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT (glucose tolerant) 株は glucose を資化可能で、(1) 光合成により CO₂ を単一炭素源とする条件 (光独立栄養条件)、(2) 光合成をせず glucose のみを炭素源とする条件 (従属栄養条件)、(3) glucose と CO₂ をともに炭素源とする条件 (混合栄養条件) で生育する (Table 1-2)。これは自然環境中においては、日中に光合成で生育し、貯蔵した糖を夜間使用するといった代謝制御に対応する。また、温度や pH、光強度によっても代謝は調節されるほか、炭素以外の栄養素がどれだけ環境中に存在するかにも影響を受け

る。栄養素の不足は、物質生産という観点からも重要である。菌体合成に必要な窒素源などの供給を制限することで、菌体増殖を抑え目的物質の収率を高めるという戦略が取られるためである (Davies *et al.*, 2014 ; van der Woude *et al.*, 2014)。

細胞はこれら異なる栄養条件で代謝を変化させるため、各条件下における代謝状態に対して、有効な代謝改変戦略を選択しなければならない。そのためには、各栄養条件における細胞の代謝状態を理解することが、重要な基礎をなすと考えられる。各栄養条件における代謝状態を把握することで、細胞の代謝調節原理の理解が進み、各条件において生産収率を高める戦略を見出すことができると期待される。

Table 1-2 *Synechocystis* が生育できる様々な栄養条件.

栄養条件	説明
光独立栄養条件	CO ₂ を単一炭素源とする
従属栄養条件	有機化合物を資化する (glucose など)
混合栄養条件	CO ₂ と有機化合物の資化を同時に行う
窒素制限条件	窒素が制限される条件

1-3 代謝フラックス解析

代謝の状態を把握するには代謝フラックスに注目することが効果的である。代謝フラックスは、単位細胞あたりの代謝反応速度 (単位 : mol/gDCW/h) と定義され、代謝フラックスの測定により、代謝経路の炭素フローの大きさや、様々な代謝経路において炭素がどのように分配されているかを明らかにすることができる。注目する代謝系にわたって網羅的に代謝フラックスを測定するには、¹³C 代謝フラックス解析が用いられる (Stephanopoulos, 1998)。これは ¹³C 標識実験と計算機処理によって、直接測定できない細胞内の代謝フラックスを間接的に推定する技術である。代謝フラックスは、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームという各制御階層の複雑な振る舞いの帰結として生じる表現型であり (Fig. 1-1)、代謝フラックス解析によって、代謝制御機構を明らかにする手掛かりを得られると考えられる。また近年、細胞が代謝フラックスの大きさ自体をセンスして代謝を制御していることも見いだされ (Kochanowski *et al.*, 2013)、代謝フラックスに注目することがますます重要となっている。代謝フラックス解析は物質生産に向けた細胞の強力な診断ツールともなりうる。細胞が基質から有用化合物を生産する過程は、まさに細胞の代謝過程を利用するものであり、実際の細胞の状態を確認することで、理想とする状態からの乖離を量的に把握することができる。別途算出された理想値とのギャップに注目することで、代謝の改変戦略を明確にすることができる (Feng *et al.*, 2010)。

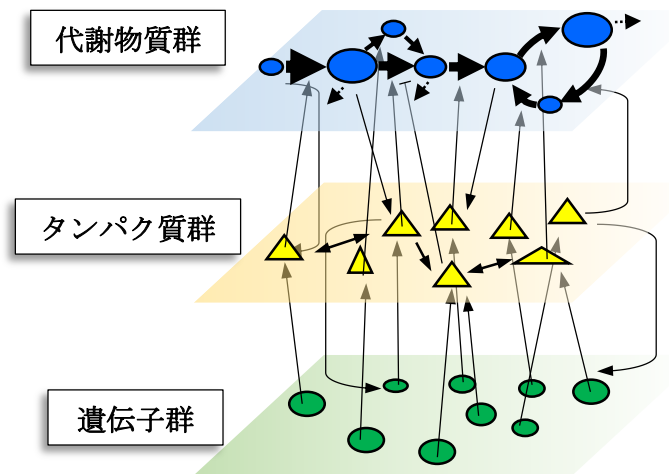


Fig. 1-1 細胞内の複雑な制御のイメージ.

各代謝反応はそれぞれ酵素による触媒作用が必要である。酵素の存在量は対応する酵素遺伝子の発現量に影響を受け、また酵素活性は遺伝子変異や翻訳後修飾、アロステリックな制御によっても影響を受ける。さらに各反応の代謝フラックスは、酵素活性や酵素濃度だけでなく、反応に関わる代謝物質の細胞内プール量にも依存して変化する。

先述のように代謝フラックスを測定するには ^{13}C 標識実験を行う。Fig. 1-2 の簡単な例を用いて、代謝物質の ^{13}C 標識パターンから代謝フラックスを間接的に推定できる原理を説明する。glucose は細胞に取り込まれると、解糖系とペントースリン酸経路という2通りの経路によって glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) という3炭素の代謝物質に変換され、経路によって glucose の炭素の GAP への引き継がれ方が異なることが生化学的な知見から分かっている。そこで、あらかじめ glucose の一部を ^{13}C 標識しておく、GAP は使用された経路に応じた ^{13}C 標識パターンを保持する。つまり GAP の ^{13}C 標識パターンを測定できれば、各経路の相対的な代謝フラックス比を決定できる。細胞の glucose の取り込み速度を測定すれば、各反応の代謝フラックスの絶対値を求めることが可能である。

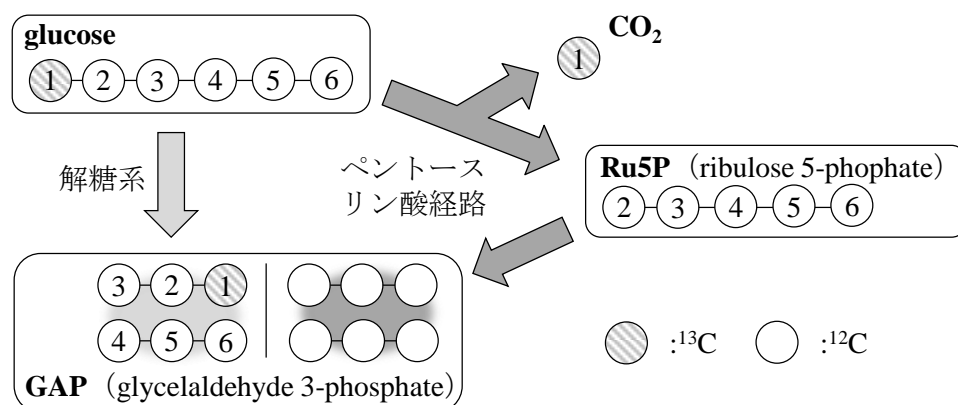


Fig. 1-2 代謝経路によって ^{13}C 標識パターンが変化するイメージ.

実際の代謝の一部を簡略化したこの図は、glucose が 2 通りの経路で glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) に変換され、経路ごとに GAP に引き継がれる炭素原子が異なることを示す。glucose の 1 位炭素を ^{13}C 標識すれば、GAP の ^{13}C 標識パターンを代謝経路に依って変化させられる。そのため、GAP 分子の ^{13}C 標識パターンから 2 経路の代謝フラックス比を求めることができる。

^{13}C 標識実験のあいだ、代謝状態は定常に保たなければならない。代謝状態が変化する場合、代謝物質の ^{13}C 標識パターンは複数の代謝状態を反映し、うまく代謝フラックス分布を推定できないためである。さらに、代謝が定常な状態で十分時間培養を継続すると、GAP の ^{13}C 標識パターンも定常となる (Fig. 1-3 A)。一般的な代謝フラックス解析法は ^{13}C 標識 glucose などを用いて培養し、 ^{13}C 標識パターンが定常になった段階で分析を行う。同位体的に定常な状態において解析を行うため、本論文では以降この手法を“同位体的定常状態における代謝フラックス解析”と定義する。

実際の解析には中央代謝系全体の代謝フラックスを推定する。多くの代謝物質の ^{13}C 標識パターンを測定することで、中央代謝系全体の代謝フラックス分布の情報を取得でき、それらを最も良く説明するように代謝フラックスの分布を推定する。代謝の定常を達成するためには連続培養系や菌体の指数増殖期で ^{13}C 標識実験を行う。測定対象とする代謝物質としてはタンパク質構成アミノ酸が用いられることが多い。アミノ酸は中央代謝の様々な中間代謝物質を前駆体として合成されるため、その ^{13}C 標識パターンは中央代謝系内の代謝フラックスの情報を有している。また構造が比較的安定で、細胞内にタンパク質として多量に存在するため、中間代謝物質と比較して測定が容易である。以上に述べた手法で多くの微生物について代謝フラックス解析が行われてきたほか、わずかであるがシアノバクテリアについても適用例が報告されている (Yang *et al.*, 2002 ; You *et al.*, 2014)。

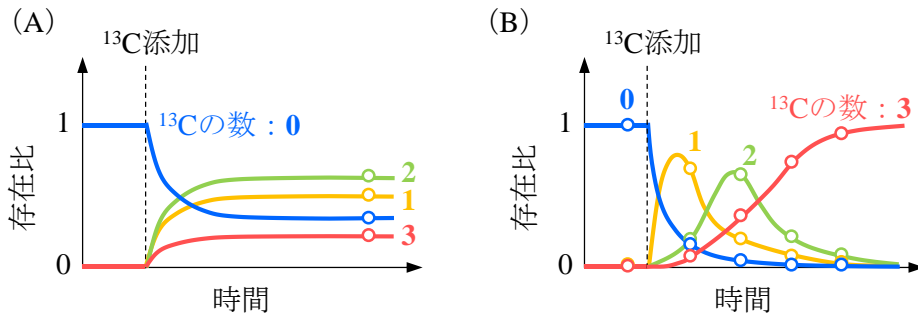


Fig 1-3 ^{13}C 標識実験における代謝物質の ^{13}C 標識パターンの時間変化.

3つの炭素を持つ代謝物質について、 ^{13}C の数ごとに分子数の割合をプロットした。代謝フラックス解析に必要な ^{13}C 標識パターンの測定は図中に丸で示した点で行う。

(A) 同位体的定常状態における解析では、基質の炭素を選択的に ^{13}C 標識するため、定常時に細胞内の代謝物質は代謝状態を反映した ^{13}C 標識パターンを持つ。そこで定常時に ^{13}C 標識パターンの測定を行い、代謝フラックスを算出する。(B) 同位体的非定常状態における解析では、最終的には細胞内の全ての炭素が、投入した ^{13}C 標識 CO_2 と同じ標識割合で標識される。そこで同位体的に非定常な時間範囲で ^{13}C 標識パターンの変化を捉え、代謝フラックスを推定する。なお図は、培養途中で 100%の ^{13}C 標識 CO_2 に切り替えた例を示している。

同位体的定常状態における解析法は、 CO_2 のみを基質とするシアノバクテリアの光独立栄養条件には適用することはできない。 CO_2 は1炭素分子であるため、 ^{13}C 標識した CO_2 を用いて細胞を培養すると、最終的に細胞内の全炭素が CO_2 と同じ比率で ^{13}C 標識され、代謝フラックスの情報が失われる (Fig. 1-3 B)。一方で代謝物質が ^{13}C で標識されていく速度は代謝フラックスや代謝物質プール量 (細胞内濃度) に依存するため、 ^{13}C 標識パターンの動的な変化過程は代謝状態の情報を保持している。より代謝フラックスが大きければその経路の代謝物質は速く ^{13}C 標識され、より代謝物質のプール量が大きければ標識は遅くなるという関係にある。そこで、シアノバクテリアの光独立栄養条件では、 ^{13}C 標識パターンの経時変化と代謝物質プール量から代謝フラックス分布を推定する新しい手法が必要となる (Fig. 1-3 B)。本手法は同位体的に非定常な過程に着目することから、“同位体的非定常状態における代謝フラックス解析”と定義する。

1-4 本論文の目的と構成

持続可能な物質・エネルギー生産システムが必要とされる社会背景において、シアノバクテリアを用いた物質生産は、既存の石油化学を代替するポテンシャルを持つ技術として実現が望まれている。実用化には細胞の物質生産性を高める必要があり、本研究では生産収率を高めるために、代謝システムの制御によって、細胞が取り込んだ炭素をより効率的に目的物質に変換させる戦略に焦点を当てる。シアノバクテリアは様々な栄養条件で代謝を調節しながら生育するため、各栄養条件において物質生産に対して最適化するように代謝状態をコントロールしなければならない。そこで本研究では、シアノバクテリアに適用できる代謝フラックス解析法を構築し、様々な栄養条件においてモデル生物である *Synechocystis* sp. PCC 6803 の代謝フラックスを解析することを目的とする。代謝フラックス解析によって *Synechocystis* の代謝フラックス分布を明らかとし、物質生産収率を高めるように代謝を改変するためにはどのような戦略が有効であるかを議論する。

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、 ^{13}C 標識 glucose を用いた *Synechocystis* の代謝フラックス解析法を開発した。従属栄養条件と混合栄養条件に代謝フラックス解析を適用し、2条件間において大きく代謝フラックス分布が変化したことを明らかにした。物質生産収率の向上には、 CO_2 排出を伴う酸化的ペントースリン酸経路の代謝フラックスを低減することが重要と考えられた。また代謝フラックス解析結果をメタボローム分析およびトランスクリプトーム分析結果と比較することで、代謝経路のフラックス変化は必ずしも対応する代謝酵素の遺伝子発現量変化によるものではないことが分かった。2条件間における、中央代謝系内の大規模な代謝フラックス分布の変化は、一部の遺伝子発現量変化によって生じたと推測された。

第3章では、これまで構築されていなかった ^{13}C 標識 CO_2 を用いた代謝フラックス解析法を開発し、光独立栄養条件における *Synechocystis* の代謝フラックス分布を解析した。 CO_2 を単一炭素源として生育する条件の代謝フラックス分布が明らかとなり、物質生産にとって理想的な代謝フラックス分布との比較を行った。光独立栄養条件で物質の生産収率を高めるには、 CO_2 固定を行うカルビンサイクルと目的物質生産経路の炭素フロー比の調節、および CO_2 排出経路や菌体構成成分の合成経路といった炭素のロスにつながる競合経路の削減が重要であることが見出された。さらに、 ^{13}C 標識実験において捉えた、代謝物質の ^{13}C 標識パターンの時間変化から代謝反応のキネティクスについて考察し、代謝反応の律速点を部分的に絞り込むことができた。

第4章では、窒素制限条件における *Synechocystis* の代謝フラックス分布を初めて明らかにした。窒素制限条件は、菌体合成を阻害し目的物質の収率を高める目的で物質生産に用いられる培養条件である。本研究では、代謝フラックス解析を適用するために

Synechocystis の硝酸トランスポータ破壊株を用いた窒素制限系を構築し、窒素が制限されていない野生株と代謝フラックス分布の差を比較した。窒素制限下では、増殖速度の低下に対して相対的に CO₂ 取り込みフラックスが大きくなったため、余剰の炭素を glycogen や CO₂ として排出したと考えられる。物質生産にはこのような炭素排出経路の代謝フラックスを低下させ、目的物質の前駆体を合成する経路に炭素をより分配する工夫が必要となる。

第5章では本研究で得られた知見をまとめ、代謝フラックスに着目してシアノバクテリアの工学的育種について述べた。

なお、本研究では炭素源の組み合わせによる *Synechocystis* の代謝変化を解析したが、glucose と CO₂ をともに使用しない条件では細胞が生育できないため、解析対象としていない。

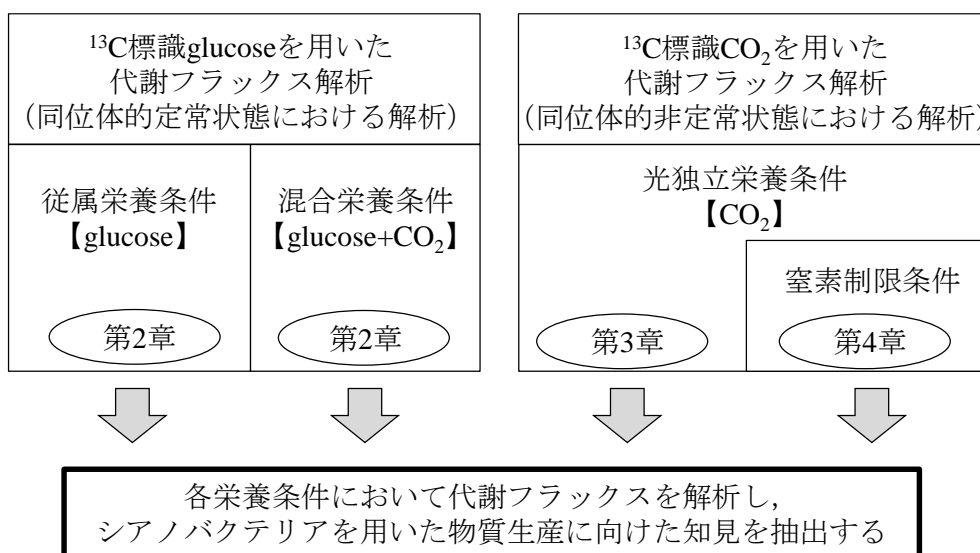


Fig. 1-4 本研究の構成とその概要.

以降の章では、代謝物質は付録に記載した略語を用いる。

2章 ^{13}C 標識 glucose を用いた混合栄養条件, 従属栄養条件の解析

2-1 緒言

シアノバクテリアは光照射下で光合成を行い, 夜間など暗条件では日中に蓄積した糖を使用して従属栄養生育する (Smith, 1983). また光合成による CO_2 固定と同時に糖を利用する混合栄養生育が可能な種も存在し, 日照条件と細胞内の貯蔵等のバランスによって代謝を制御すると考えられる. シアノバクテリアのモデル生物である *Synechocystis* sp. PCC 6803 は細胞外の glucose を取り込み利用できる GT (glucose tolerant) 株が取得されており (Williams, 1988), glucose を基質として生育することができる. 物質生産に対しても, glucose を炭素源とする混合栄養条件, 従属栄養条件は重要と考えられる. 自然光で菌体を培養する場合は昼夜サイクルや天候の影響が避けられず, よって光独立栄養生育時だけでなく混合および従属栄養生育時も代謝を制御する必要が生じるためである. 加えて, 糖を添加した条件で培養を行う物質生産プロセスも提案されている (Bumbak *et al.*, 2011 ; Trabelsi *et al.*, 2013). そこで混合栄養条件, 従属栄養条件における細胞の代謝状態を理解することは, 物質生産に向けた代謝改変戦略を見出すために重要なステップであると考えられる. これまでに混合栄養条件や従属栄養条件下においてメタボローム解析やプロテオーム解析 (Kurian *et al.*, 2006 ; Takahashi *et al.*, 2008) などが行われたほか, ^{13}C 代謝フラックス解析も数例実施例が報告されている (Yang *et al.*, 2002 ; You *et al.*, 2014).

本研究では混合栄養条件および従属栄養条件において代謝フラックスの違いを解析することを目的とし, 目的物質の生産収率を高めるためにどのように代謝を改変すれば良いか考察を行った. さらにメタボロームデータ, トランスクリプトームデータと比較して代謝変化がどのように生じたかを考察した. 混合栄養条件では菌体に CO_2 と glucose をともに資化させるために glucose を含む培地を用いて光照射下で細胞を培養した. 一方, 従属栄養条件は, 混合栄養条件の培地に光合成阻害剤である atrazine を添加することで構築し, 光合成の阻害により細胞が glucose を主な基質として使用するようにした. 以上の 2 条件における *Synechocystis* のメタボローム分析およびトランスクリプトーム分析データが取得されている (Yoshikawa *et al.*, 2013). そこで本研究では代謝フラックスの推定と, 3つのオーム階層間の対応の解析を行った.

本章では ^{13}C 標識 glucose を用いた同位体的定常状態における代謝フラックス解析を行った. これは Yang らや You らの先行研究でも用いられた手法であるが, 本研究では近年得られた知見をもとに *Synechocystis* 細胞の代謝モデルの検討を行ったほか, 代謝

フラックスの推定精度を高める実験デザインの検討, 算出した代謝フラックスの精度の議論などを行った. メタボロームデータとトランスクリプトームデータより中央代謝系において代謝フラックス分布の変化が推測されており (Yoshikawa *et al.*, 2013), 代謝フラックス解析によって実際に炭素フローを量的に捉えられる. また各オームデータより, 遺伝子発現量, 代謝物質プール量, 代謝フラックスの変化を比較することができる. 代謝フラックスの調節は, 代謝物質プール量だけでなく, 酵素の発現量や, 酵素の構造など複雑な要因が影響するため, オーム階層を縦断的に捉えることで代謝変化のメカニズムを特定しやすくなると考えられる.

2-2 実験材料と実験方法

2-2-1 使用菌株

Synechocystis sp. PCC 6803 GT 株を使用した.

2-2-2 使用培地

本研究では¹³C代謝フラックス解析を行うにあたり細胞が様々な基質を資化するのを避けるため、できるだけ炭素源を含まないように培地を改変して用いた. 具体的には *Synechocystis* の培養に通常用いられる BG11 培地の Na₂CO₃ と citric acid を除き, ferric ammonium citrate を等量の NH₄Cl と FeCl₂ に置き換えた. これによって, 使用した改変 BG11 培地には HEPES と EDTA 2Na 以外に炭素化合物が含まれていない. Table 2-1 に標準 BG11 と改変 BG11 の組成を示す. 平板培地を作成するにはさらに 0.3% sodium thiosulfate, 1.5% Bact Agar (Difco) を添加した. また, 本章の混合栄養条件, 従属栄養条件では 5 mM glucose を添加し, 従属栄養条件では 20 μM atrazine (Sigma aldrich) を添加した.

Table 2-1 標準 BG11 および改変 BG11 の組成.

成分	標準 BG11 (mM)	改変 BG11 (mM)
EDTA 2Na	2.7×10^{-3}	2.7×10^{-3}
NaNO ₃	1.8×10	1.8×10
H ₃ BO ₃	4.6×10^{-2}	4.6×10^{-2}
HEPES	2.0×10	2.0×10
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	8.7×10^{-5}	8.7×10^{-5}
K ₂ HPO ₄	2.2×10^{-1}	2.2×10^{-1}
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.0×10^{-1}	3.0×10^{-1}
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.6×10^{-1}	2.6×10^{-1}
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9.1×10^{-3}	9.1×10^{-3}
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7.7×10^{-4}	7.7×10^{-4}
CuSO ₄ ·5H ₂ O	3.2×10^{-4}	3.2×10^{-4}
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	1.7×10^{-4}	1.7×10^{-4}
Na ₂ CO ₃	1.9×10^{-1}	
citric acid	3.1×10^{-2}	
ferric ammonium citrate	8.2×10^{-3}	
FeCl ₂ ·4H ₂ O		1.6×10^{-2}
NH ₄ Cl		2.5×10^{-2}

2-2-3 培養操作

前培養は、100 mL 改変 BG11 培地に終濃度 5 mM となるように glucose を添加し、500 mL 三角フラスコを用いて行った。培養には振盪培養器 BR-43FL (タイテック) を用いて、34°C, 150 rpm で約 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ の LED (LC-LED 450W, タイテック) による連続光照射下で振盪を行った。前培養の植菌には glucose を添加せず光独立栄養条件で培養した菌体を用いて、初期菌体濃度を $\text{OD}_{730} = 0.05$ となるように植え継いだ。

本培養は、基本的に前培養と同じ条件を用いた。混合栄養条件および従属栄養条件においてそれぞれ繰り返し回数 3 で培養を行った。培地に添加した glucose は ^{13}C 標識 glucose であり、その ^{13}C 標識パターンは、あらかじめ検討した結果 $[1-^{13}\text{C}]\text{glucose}$ (1 位の炭素が ^{13}C 標識された glucose) と $[\text{U}-^{13}\text{C}]\text{glucose}$ (全ての炭素が ^{13}C 標識された glucose) を 0.7:0.3 の割合で混合して用いた。植菌には指数増殖中の前培養の細胞を、それぞれ初期菌体濃度が $\text{OD}_{730} = 0.03$ となるように植え継いだ。

メタボロームおよびトランスクリプトームデータは、Yoshikawa らの先行研究によって本研究と同様の培養条件で測定された (Yoshikawa *et al.*, 2013)。培養には振盪培養器 MIR-154 (サンヨー) を用いて、34°C, 150 rpm で白色蛍光灯により約 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ の光照射下で振盪培養した。分析に供する菌体は指数増殖中の $\text{OD}_{730} = 0.8$ および 0.6 でそれぞれメタボローム分析、トランスクリプトーム分析用に取得した。

2-2-4 測定項目と測定方法

分光光度計 UVmini-1240 (島津製作所) を用いて、波長 730 nm における培養液の濁度 (OD_{730}) を測定した。

2-2-4-1 光強度

光量子計 (LI-190SA および LI-250A, LI-COR) を用いて光量子束密度を測定した (単位: $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$)。

2-2-4-2 glucose 濃度

酵素電極を用いたバイオセンサー (BF-5, 王子計測) を用いて培養液中の glucose 濃度を測定した。

2-2-4-3 *gap1* 遺伝子発現量

RNA 抽出には、菌体濃度 (OD_{730}) \times 培養液量 (mL) = 10 となる菌体量を用いた。すなわち指数増殖期の $OD_{730} \approx 0.6$ の菌体を約 16.5 mL 回収し、速やかに等量の、10% (w/v) phenol を含む ethanol と混合した。遠心分離の後、菌体ペレットを液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。RNA は Ambion RiboPure Yeast Kit (Life Technologies) を用いて抽出し、PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した。

gap1 発現量の定量にはリアルタイム定量逆転写 PCR を用い、恒常的に発現することが知られる *rnpB* 遺伝子 (Pinto *et al.*, 2012) に対する相対発現量として定量した。反応には cDNA サンプルを SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ) と混合し Table 2-2 に示すプライマーを使用し、qRT-PCR を StepOne Plus Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて行った。

Table 2-2 使用したプライマー.

遺伝子	配列 (5'→3')
<i>gap1</i>	CCGGCATTGGTCTGAACAGC
	GTCTTTGCTCGCCATGGTC
<i>rnpB</i>	GTAAGAGCGCACCAGCAGTATC
	TCAAGCGGTTCCACCAATC

2-2-5 代謝フラックス解析

2-2-5-1 解析原理概要

^{13}C 代謝フラックス解析では、 ^{13}C 標識実験によって代謝フラックスの推定を行う (Wiechert, 2001 ; Zamboni *et al.*, 2009 ; Fig. 2-1). ^{13}C 標識された glucose を炭素源として細胞を培養すれば、細胞内の代謝物質を ^{13}C 標識することができる。 ^{13}C 標識実験を行う時間範囲で代謝フラックスが変化しない状態を維持すれば、各代謝物質は代謝フラックス分布を反映した特有の ^{13}C 標識パターンを持つようになる。これを本論文では“代謝的定常状態”と定義する。実験的に代謝的定常状態を構築するには、回分培養の指数増殖期や、連続培養において、比増殖速度や化合物の比生産 (消費) 速度を定常に保つ必要がある。一方で、代謝モデルを用いたシミュレーションによって glucose の ^{13}C 標識パターンと代謝フラックス分布から、各代謝物質の ^{13}C 標識パターンを算出することができる。代謝モデルは、*Synechocystis* の中央代謝系について、各代謝反応において基質から生成物にどのように炭素が引き継がれるかという情報を含んでいる。計算機上の試行と実際の実験結果が比較可能であるので、実験的に測定された代謝物質の ^{13}C 標識パターンに対応するような代謝フラックス分布を推定する。以上の手順によって、 ^{13}C

代謝フラックス解析では、直接測定することができない代謝フラックス分布を間接的に推定することが可能である。

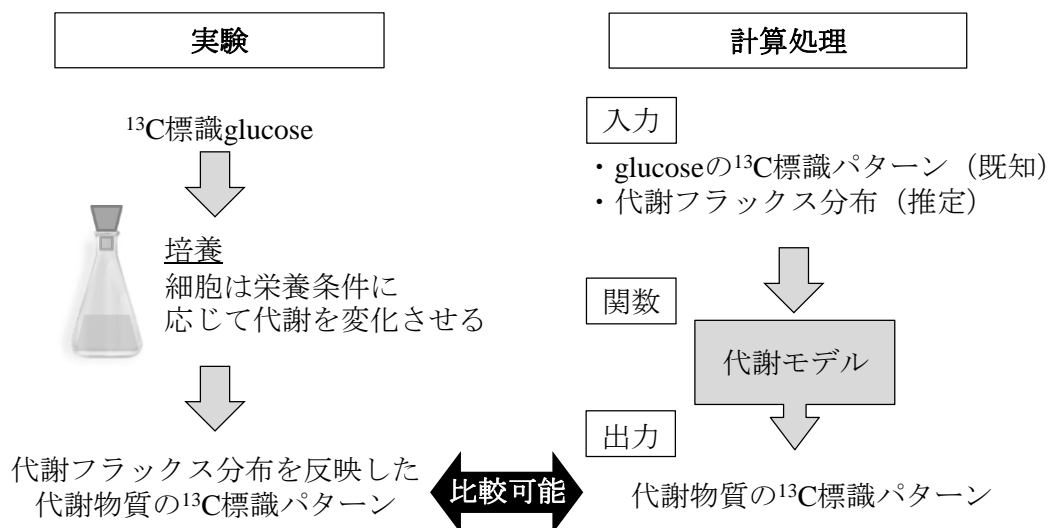


Fig. 2-1 代謝フラックス解析の手順の概要.

代謝フラックス解析では、直接測定できない代謝フラックスを、¹³C 標識パターンを介して間接的に推定する。実験的に測定した ¹³C 標識パターンは代謝状態に関する情報を含んでいる。計算機を用いて、実測結果に対応する ¹³C 標識パターンを生成する代謝フラックス分布を算出する。

2-2-5-2 代謝経路の数理モデル化

分子レベルでの代謝のモデル化

代謝フラックス解析では各代謝フラックスに変動はなく、式(1)に示すように各代謝物質の合成速度と消費速度が釣り合っている代謝的定常状態であると仮定する。

$$\frac{d}{dt}P_{\text{metabolite}} = r_{\text{synthesis}} - r_{\text{consumption}} = 0 \quad (1)$$

ここで、 $P_{\text{metabolite}}$ は代謝物質プール量 (単位: mol/gDCW {dry cell weight}), $r_{\text{synthesis}}$ と $r_{\text{consumption}}$ はそれぞれ注目する代謝物質の生成および消費フラックス (単位: mol/gDCW/h) を示す。続いて Fig. 2-2 に示す代謝経路を用いて説明する。

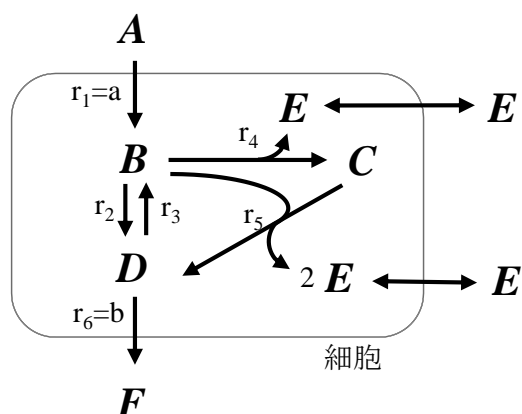


Fig. 2-2 代謝経路の例.

$A \sim F$ は代謝物質, $r_1 \sim r_6$ は各反応の代謝フラックス値を表す. 基質 A の取り込みフラックス $r_1 = a$, 生成物 F の生成フラックス $r_6 = b$ は測定可能であるとする. また E は CO_2 を想定した代謝物質であり, 細胞内外で交換が自由に行えるとする.

細胞内の代謝物質 B, C, D について立てられる収支式は, 代謝的定常状態より代謝物質プール量が増加しないことを仮定しているため, 式(2)~(4)のように表される.

$$\frac{dP_B}{dt} = r_1 - r_2 + r_3 - r_4 - r_5 = 0 \quad (2)$$

$$\frac{dP_C}{dt} = r_4 - r_5 = 0 \quad (3)$$

$$\frac{dP_D}{dt} = r_2 - r_3 + r_5 - r_6 = 0 \quad (4)$$

行列を用いて式(2)~(4)を記述すると,

$$\begin{pmatrix} 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 1 & -1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \\ r_4 \\ r_5 \\ r_6 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (5)$$

と書ける. またここで, $r_1 (=a)$, $r_6 (=b)$ は測定可能な代謝フラックスであるため, 式(5)を以下のように拡張することができる.

$$\begin{pmatrix} 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 1 & -1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \\ r_4 \\ r_5 \\ r_6 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ a \\ b \end{pmatrix} \quad (6)$$

求めるべき代謝フラックス分布が $r_1 \sim r_6$ の 6 変数からなるのに対して，有効な制約式が 5 つであり，代謝フラックス分布は唯一解を持たない．この代謝経路では， r_2 （もしくは r_3 ）を決定できれば変数の数だけ独立な式が存在し，代謝フラックス分布全体を決定することができる．そこで，式(6)をさらに以下のように拡張する．

$$\begin{pmatrix} 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 1 & -1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \\ r_4 \\ r_5 \\ r_6 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ a \\ b \\ c \end{pmatrix} \quad (7)$$

よって c を決定できれば， $r_1 \sim r_6$ の代謝フラックス分布を決定することができる．

^{13}C 標識パターンの表現方法

以下では， ^{13}C 標識実験がどのように記述されるかを説明する．代謝物質の同位体標識のバリエーションの表現には *isotopomer* という概念が用いられる (Schmidt *et al.*, 1997)．炭素数 n の代謝物質は， ^{13}C 標識のされ方が 2^n 通り存在し，各パターンの存在割合は *isotopomer distribution vector* (IDV) というベクトルを用いて表現することができる．IDV は 2^n 個の要素を持ち，その要素の合計は 1 となるように規格化される．例として，3 炭素分子 pyruvate (PYR) の場合について考える．

$$\text{IDV}_{\text{PYR}} = \begin{pmatrix} \text{IDV}_{\text{PYR}}[000] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[001] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[010] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[011] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[100] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[101] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[110] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[111] \end{pmatrix} \quad (8)$$

$$\left(\sum_{i=000}^{111} \text{IDV}_{\text{PYR}}[i] = 1 \right)$$

ここで， $\text{IDV}_{\text{PYR}}[011]$ とは，代謝物質の 1 位の炭素が ^{12}C (0 として表現)，2, 3 位の炭素が ^{13}C (1 として表現) である標識パターンの存在割合を示す．

代謝物質の ^{13}C 標識パターンは一般的に質量分析計を用いて測定される．質量分析計は，分子の質量ごとの存在比を測定でき，これは *mass distribution vector* (MDV) として記述される (Wittmann *et al.*, 1999)．以下に PYR の MDV と，IDV の関係を示す．

$$\text{MDV}_{\text{PYR}} = \begin{pmatrix} \text{MDV}_{\text{PYR}}[M+0] \\ \text{MDV}_{\text{PYR}}[M+1] \\ \text{MDV}_{\text{PYR}}[M+2] \\ \text{MDV}_{\text{PYR}}[M+3] \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \text{IDV}_{\text{PYR}}[000] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[001] + \text{IDV}_{\text{PYR}}[010] + \text{IDV}_{\text{PYR}}[100] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[011] + \text{IDV}_{\text{PYR}}[101] + \text{IDV}_{\text{PYR}}[110] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[111] \end{pmatrix} \quad (9)$$

$$\left(\sum_i \text{MDV}_{\text{PYR}}[M+i] = 1 \right)$$








ここで M とは PYR の分子量を示す。 $\text{MDV}_{\text{PYR}}[M+2]$ は、 ^{13}C を 2 つ含む PYR が PYR 分子全体に占める割合を示し、 $\text{IDV}_{\text{PYR}}[011]$ と $\text{IDV}_{\text{PYR}}[101]$ 、 $\text{IDV}_{\text{PYR}}[110]$ の合計となる。 IDV は ^{13}C 標識されている炭素の位置情報を有するが、 MDV は IDV の情報が不可逆圧縮され ^{13}C の数しか情報を持たない。

EMU の定義

代謝物質の ^{13}C 標識パターンを計算機上で表現する際に、その計算コストを削減するためのフレームワークとして elementary metabolite unit (EMU) が考案されている (Antoniewicz *et al.*, 2007 ; Young *et al.*, 2008) . 通常は、 MDV の測定対象となる代謝物質は、代謝モデルで考慮する代謝物質の一部である。実験データとの比較に必要がない ^{13}C 標識パターンの算出を敢えて行わないことで、計算量を減らすことができる。以下に、Antoniewicz らの文献における記述を参考に EMU について説明する。

EMU は、ある代謝物質について重複しない炭素の組み合わせの 1 つを示す。例えば 3 炭素である代謝物質 A について考える。Table 2-3 に示したように、EMU は 3 炭素の取り合わせのセットとなる。EMU のサイズは、その EMU に含まれる炭素数を示すとする。考えられる 7 パターンの EMU として、サイズ 1 の EMU が 3 通り (A_1 , A_2 , A_3)、サイズ 2 の EMU が 3 通り (A_{12} , A_{13} , A_{23})、サイズ 3 の EMU が 1 通り (A_{123}) である。


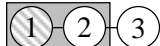
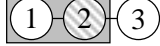

Table 2-3 EMU の定義.

EMU	EMUに 含まれる炭素	EMU サイズ
A_1		1
A_2		1
A_3		1
A_{12}		2
A_{13}		2
A_{23}		2
A_{123}		3

A_{123} の下付き数字はその EMU に含まれる炭素を示す.

さらに各 EMU はそれぞれ MDV を持つ. 例えば EMU A_{12} は ^{13}C の位置の組み合わせによって Table 2-4 のように 3 種の MDV の要素が考えられる.

Table 2-4 EMU と MDV の関係.

MDV	^{13}C 標識位置	^{13}C 数
$A_{12, M+0}$		0
$A_{12, M+1}$		1
		1
$A_{12, M+2}$		2

^{13}C は網掛けで示す.

EMUによる代謝反応の記述

縮合反応，開裂反応，単分子反応という異なる3通りの反応がEMUを用いてどのように表現されるかをFig. 2-3に示す. 各反応において，生産物である代謝物質CのMDV，すなわち C_{123} に関わる最小の要素を考える. 縮合反応については， C_{123} は A_{12} と B_1 のMDVから決定することができる. 開裂反応および単分子反応では， C_{123} は A_{123} に一致し，開裂反応においてAの炭素のうちCに移らないものは考慮されない. また，EMUのサイズは両辺で等しくなる. このように，EMUレベルでの反応の記述は，縮合反応と単分子反応のみとなる.

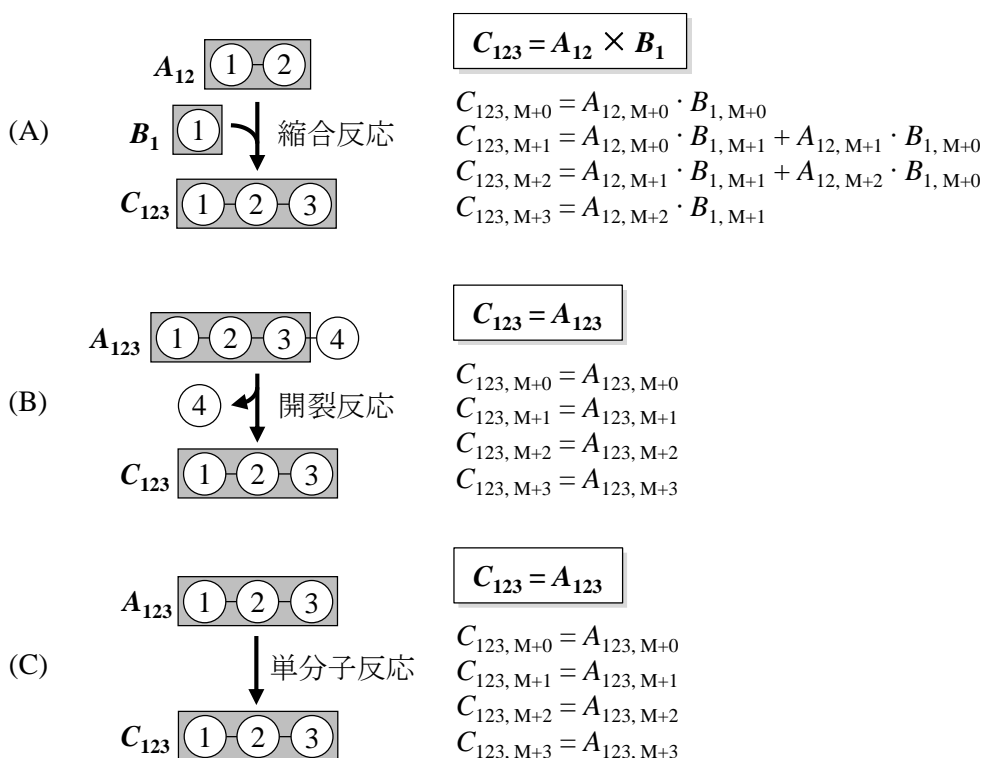


Fig. 2-3 EMU を用いた反応の記述.

EMUによる代謝経路の記述

Fig. 2-4 に示す例を用いて，代謝経路内の炭素原子の移動をEMUで表現し，目的とする代謝物質のMDVを基質のMDVで記述するしくみを説明する. ここでは代謝物質Aが単一基質であり，代謝物質E，Fが代謝経路で産生される物質である. この代謝経路における炭素原子の移動をTable 2-5に示す.

ズ 1 とサイズ 2 の EMU 経路は Fig. 2-6 に示すようになる。

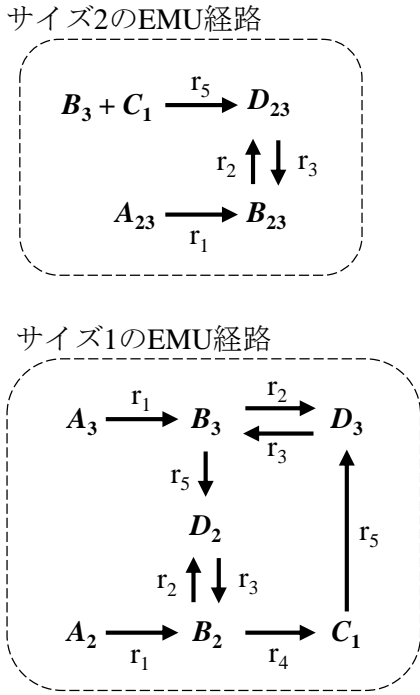


Fig. 2-6 代謝物Fに関する
サイズ1, サイズ2のEMU経路.

Table 2-6 代謝物Fに関わるEMU反応リスト.

反応番号	EMU反応
6	$D_{123} \rightarrow F_{123}$
2	$B_{123} \rightarrow D_{123}$
5	$B_{23} + C_1 \rightarrow D_{123}$
1	$A_{123} \rightarrow B_{123}$
3	$D_{123} \rightarrow B_{123}$
1	$A_{23} \rightarrow B_{23}$
3	$D_{23} \rightarrow B_{23}$
2	$B_{23} \rightarrow D_{23}$
5	$B_3 + C_1 \rightarrow D_{23}$
4	$B_2 \rightarrow C_1$
1	$A_2 \rightarrow B_2$
3	$D_2 \rightarrow B_2$
2	$B_2 \rightarrow D_2$
5	$B_3 \rightarrow D_2$
1	$A_3 \rightarrow B_3$
3	$D_3 \rightarrow B_3$
2	$B_3 \rightarrow D_3$
5	$C_1 \rightarrow D_3$

EMUの収支式

構築した EMU 経路において, 各 EMU の MDV がどのように互いに影響しあうかを表現することができる. 例として, サイズ 1 の EMU C_1 について考える. C_1 には B_2 からの代謝フラックス r_4 が流入するとともに, r_5 ($=r_4$) というフラックスが流出する. そこで EMU C_1 の時間変化は C のプール量 P_C を用いて以下の式で表すことができる.

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{r_4 B_2 - r_4 C_1}{P_C} \quad (10)$$

同様にサイズ 1 の EMU 経路の C_2 , D_2 , B_3 , D_3 について

$$\frac{dB_2}{dt} = \frac{r_1 A_2 + r_3 D_2 - (r_1 + r_3) B_2}{P_B} \quad (11)$$

$$\frac{dD_2}{dt} = \frac{r_2 B_2 + r_5 B_3 - (r_2 + r_5) D_2}{P_D} \quad (12)$$

$$\frac{dB_3}{dt} = \frac{r_1 A_3 + r_3 D_3 - (r_1 + r_3) B_3}{P_B} \quad (13)$$

$$\frac{dD_3}{dt} = \frac{r_2 B_3 + r_5 C_1 - (r_2 + r_5) D_3}{P_D} \quad (14)$$

これを行列を用いて書き換えると、

$$\begin{pmatrix} P_C \\ P_B \\ P_D \\ P_B \\ P_D \end{pmatrix} \frac{d \begin{pmatrix} C_1 \\ B_2 \\ D_2 \\ B_3 \\ D_3 \end{pmatrix}}{dt} = \begin{pmatrix} -r_4 & r_4 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -r_1 - r_3 & r_3 & 0 & 0 \\ 0 & r_2 & -r_2 - r_5 & r_5 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -r_1 - r_3 & r_3 \\ r_5 & 0 & 0 & r_2 & -r_2 - r_5 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1 \\ B_2 \\ D_2 \\ B_3 \\ D_3 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ r_1 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & r_1 \\ 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_2 \\ A_3 \end{pmatrix} \quad (15)$$

となる。さらにこれはサイズ n の EMU 経路について一般化すると以下のようなになる。

$$P_n \frac{dX_n}{dt} = \alpha_n X_n + \beta_n Y_n \quad (16)$$

α , β は係数行列, X は求める EMU の ^{13}C 標識パターン, Y は基質の ^{13}C 標識パターンである。本章における解析では, 同位体的に定常, すなわち代謝物質の ^{13}C 標識が時間的に変化しない系を対象としている。そのため式(16)は

$$\alpha_n X_n + \beta_n Y_n = 0 \quad (17)$$

と変形できる。この方程式が各サイズ n の EMU 経路についてそれぞれ構築できる。式(17)で表されるサイズ 1 のネットワークについてみると, Y_1 は実験に使用する基質の ^{13}C 標識パターンより既知であるため, フラックス分布 (α_1 , β_1) を決定すると X_1 を決定することができる。続いてサイズの大きな EMU 経路について X_n を解いていくことで, F_{123} の MDV を算出することができる (Fig. 2-7)。

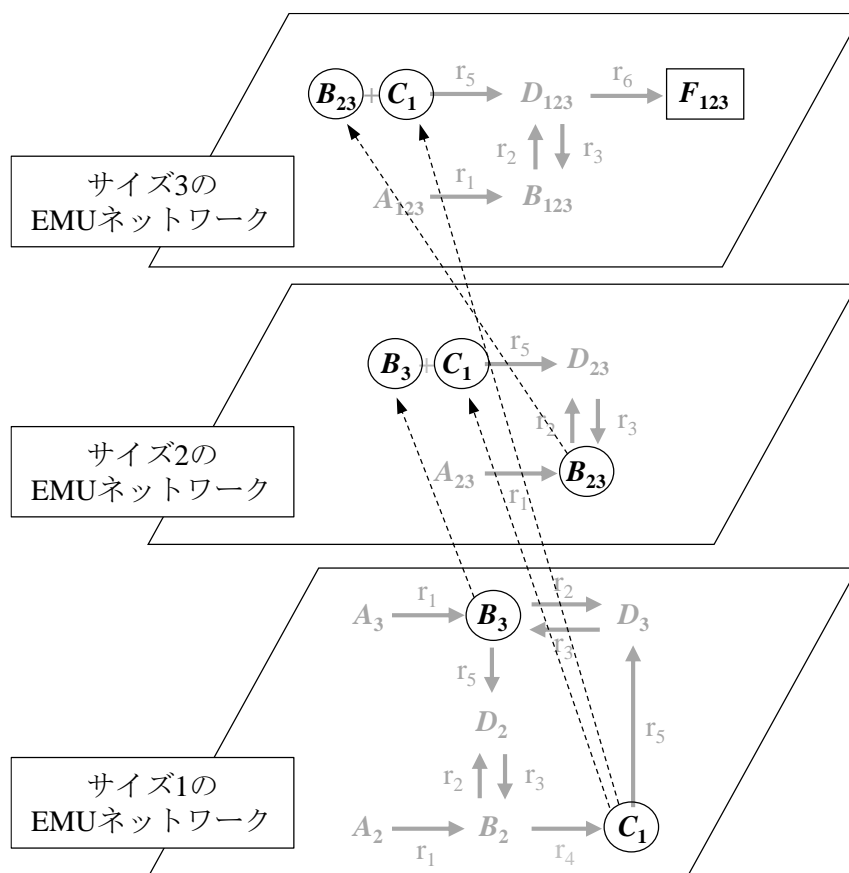


Fig. 2-7 EMU 経路の階層構造. サイズの大きな EMU の MDV を算出するには、より低い階層の EMU の情報が必要となる.

2-2-5-3 GC-MS によるアミノ酸の ^{13}C 標識パターンの分析

本章の代謝フラックス解析では、タンパク質構成アミノ酸を ^{13}C 標識パターン (MDV) の分析対象とし、分析はガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を用いた。

サンプル調製

指数増殖期 ($\text{OD}_{730} = 0.5-0.6$) の培養液から菌体を回収し、6N HCl を 2 mL 加えボルテックスし、ガラスアンプルに移した。アスピレーターを用いてガラスアンプル内を減圧し、ガラスアンプルの口を閉じた。ドラフト内にてブロックインキュベータで 105°C で 18 h 処理することでタンパク質をアミノ酸に加水分解した。加水分解溶液はフィルターでろ過しマイクロチューブに移した。

サンプル誘導体化

タンパク質加水分解溶液をガラスバイアル瓶に移し，遠心エバポレータ（SAVANT SPD1010, Thermo Scientific）でサンプルを乾固させ，サンプルに 50 μL acetonitrile, 50 μL *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide) and acetonitrile（MTBSTFA, Thermo Scientific）を添加し，105°C で攪拌させながら 60 min 反応させた．反応後攪拌しながら室温で 60 min クーリングを行った．反応液をマイクロチューブに移し遠心処理した後，上清をバイアルに挿入したガラスインサートに移した．

MTBSTFA による TBDMS (*tert*-butyldimethylsilyl) 化反応により，アミノ酸は Fig.2-8 のように修飾される．

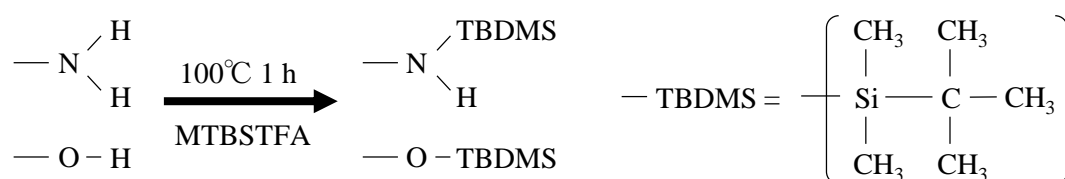


Fig. 2-8 TBDMS 化反応.

分析

GC-MS分析は，Agilent 7890A GC と 5975C Gas chromatograph/ Mass Selective Detector（Agilent Technologies）を用い，カラムにはCapillary column（DB-5MS+DG；30m×0.25 mm ID×0.25 μm ；Agilent Technologies）を用いて行った．heliumをキャリアーガスとし，流速は1.0 mL/minとした．オープン温度は始め150°Cで2 min保ち，その後270°Cになるまで3°C/minで上昇させた．インターフェース温度は150°C，イオン源温度は230°C，インジェクション量は1 μL で，スプリット比は1:10，電子イオン化は70 eV，Selected ion monitoringモードで分析した．またTBDMS化されたアミノ酸はイオン化時に電子衝撃によりFig. 2-9のように断片化が起きる（Mawhinney *et al.*, 1986）．

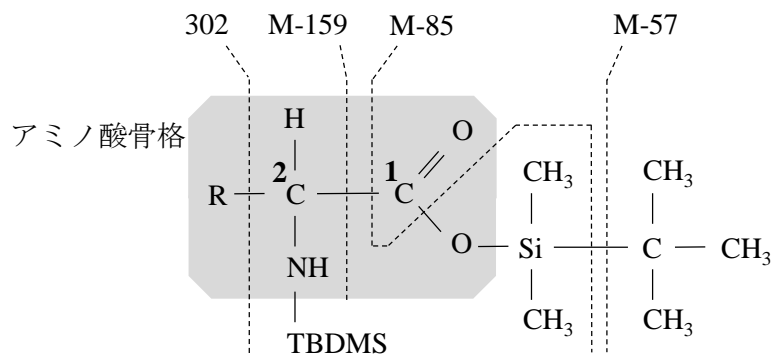


Fig. 2-9 測定される主なフラグメントイオンのパターン.

一部の炭素原子の左肩にある数字は、アミノ酸における炭素の位置番号を示す. M-57 フラグメント：全ての炭素骨格の情報を持つ， M-85 フラグメント：1位の炭素の情報が見失われている， M-159 フラグメント：1位の炭素の情報が見失われている， 302 フラグメント：アミノ酸の側鎖が解離した構造のため，全アミノ酸で共通である. 1, 2位の炭素の情報を持つ. なおフラグメント名は親イオンの質量電荷比 M (m/z) からいくらの m/z の構造が解離したかを表している.

2-2-5-4 マススペクトルからのMDVの算出

MDVとは、代謝物質分子の質量ごとの存在比として計算される (Fig. 2-10, 式(19)). MDVは質量分析計を用いることで測定することができ、 ^{13}C 標識されている炭素の位置情報を含まない. ただしある分子について炭素間結合が開裂した断片についてそれぞれMDVが測定できれば、部分的に ^{13}C 標識されている炭素の位置情報を取得できる.

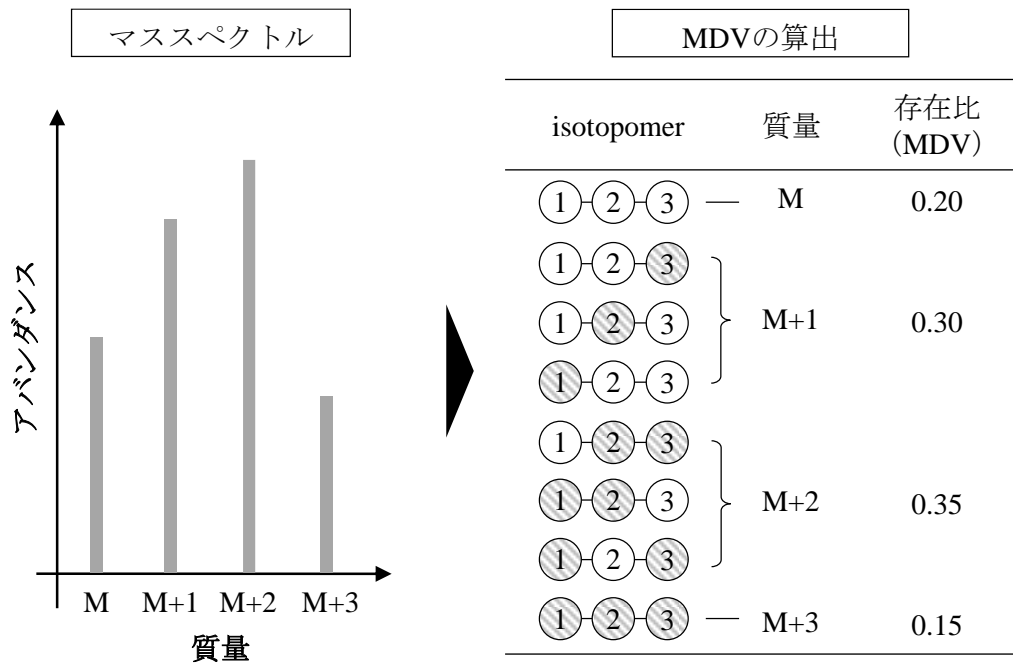


Fig. 2-10 MDV の算出方法.

代謝物質ごとに、質量ごとの存在比を算出することで MDV を算出する。M は測定対象物質の分子量を示す。図中で ^{13}C は網掛けで示す。

2-2-5-5 初期菌体量の補正

本実験では回分培養した細胞について代謝フラックス解析を行った。本培養中に生成されるタンパク質の ^{13}C 標識パターンはその代謝状態を反映するものとなるが、前培養から持ち込まれた菌体が保持する炭素は天然同位体比で標識されている (Fig. 2-11)。本実験ではサンプル回収時の菌体濃度 ($\text{OD}_{730} = 0.5-0.6$) に対して初期菌体濃度 ($\text{OD}_{730} = 0.03$) が無視できないため、その補正を行った。

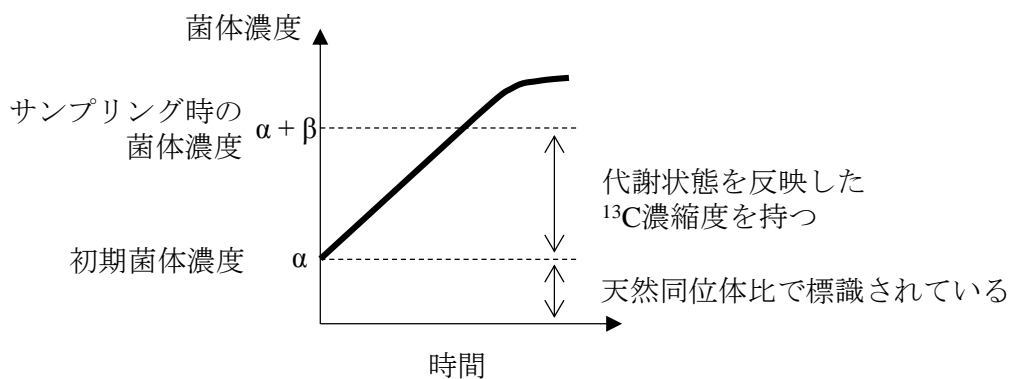


Fig. 2-11 初期菌体量補正の必要性.

初期菌体濃度を α , 培養によって β だけ濃度が増加したとして,

$$\alpha + \beta = 1 \quad (18)$$

と規格化すると, 各区分での MDV は以下のような関係を持つ.

$$\alpha \text{MDV}_x + \beta \text{MDV}_y = \text{MDV}_z \quad (19)$$

ただし MDV_x は天然同位体比, MDV_y は本培養中の代謝状態を反映した MDV, z は実測の MDV_z である. これより目的の情報を持つ MDV_y を求めることで, 前培養の菌体の持ち込み量を補正した.

2-2-5-6 天然同位体比の補正

代謝物質は ^{13}C 標識基質由来の ^{13}C 以外にも, Table 2-7 に示す割合で天然に存在する安定同位体を含んでいる. そこで代謝物質の骨格炭素のみに注目するために, これらの影響を予めキャンセルする必要がある.

Table 2-7 安定同位体の天然存在比.

元素	同位体	天然存在比 (%)
H	^1H	99.989
	^2H	0.012
C	^{12}C	98.93
	^{13}C	1.07
N	^{14}N	99.636
	^{15}N	0.364
O	^{16}O	99.757
	^{17}O	0.038
	^{18}O	0.205
Si	^{28}Si	92.223
	^{29}Si	4.685
	^{30}Si	3.092

例として formate (CH_2O_2) を挙げて説明する. C, H, O の全元素を考慮すると観測されうる生の MDV_{raw} は, 要素数 8 である (最も重く標識された $^{13}\text{C}^2\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ のとき質量数は $M+7$ となる). 一方, formate は 1 炭素分子であるから, C について補正された MDV_{corr} は要素数 2 である. ^{13}C 数の情報のみを持つ MDV_{corr} に H, O の天然同位体比を乗せる補正行列[H], [O]を掛けることで, MDV_{raw} を次のように表現する.

$$\text{MDV}_{\text{raw}} = [\text{H}] \cdot [\text{O}] \cdot \text{MDV}_{\text{corr}} \quad (20)$$

ここで formate の[H], [O]は以下の通りである. なお式中の p , q はそれぞれ ^1H , ^2H の存在割合, s , t , u は ^{16}O , ^{17}O , ^{18}O の存在割合である.

$$[H] = \begin{bmatrix} p^2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2pq & p^2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ q^2 & 2pq & p^2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & q^2 & 2pq & p^2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & q^2 & 2pq & p^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & q^2 & 2pq & p^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & q^2 & 2pq & p^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & q^2 & 2pq & p^2 \end{bmatrix} \quad (21)$$

$$[O] = \begin{bmatrix} s^2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2st & s^2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ t^2 + 2su & 2st & s^2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2tu & t^2 + 2su & 2st & s^2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ u^2 & 2tu & t^2 + 2su & 2st & s^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & u^2 & 2tu & t^2 + 2su & 2st & s^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & u^2 & 2tu & t^2 + 2su & 2st & s^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & u^2 & 2tu & t^2 + 2su & 2st & s^2 \end{bmatrix} \quad (22)$$

よって MDV_{corr} を MDV_{raw} より算出するには, 以下のように計算すれば良い.

$$\text{MDV}_{\text{corr}} = [H]^{-1} \cdot [O]^{-1} \cdot \text{MDV}_{\text{raw}} \quad (23)$$

2-2-5-7 代謝反応モデル

Synechocystis の中央代謝モデルを, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) や METACYC (<http://metacyc.org/>) といったデータベースの情報を参考にして構築した (Fig. 2-12, Table S-1). この代謝モデルは解糖系, 酸化的ペントースリン酸経路 (OPP 経路), カルビンサイクル, TCA サイクル, 補充経路 ($\text{PEP} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{OAA}$), リンゴ酸酵素経路 ($\text{MAL} \rightarrow \text{PYR} + \text{CO}_2$), グリオキシル酸経路, TCA バイパス経路を含んでいる. また, *Synechocystis* の中央代謝経路の詳細を Fig. S-1 に示す.

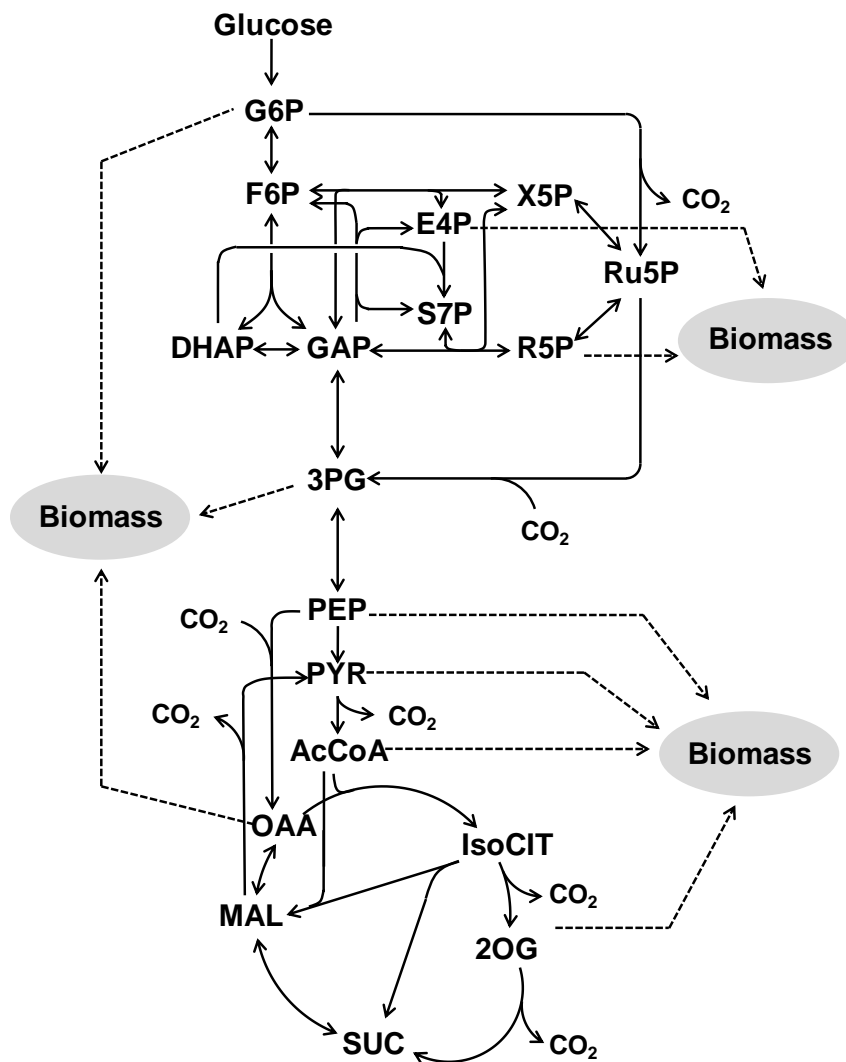


Fig. 2-12 構築した *Synechocystis* の中央代謝モデル.

一方向の矢印は不可逆反応，両方向の矢印は可逆反応を示す．点線の矢印はバイオマスへ向かう反応である．バイオマスとは菌体構成成分を表し，バイオマス合成反応は後述する中央代謝系外への流出反応にあたる．代謝反応式のリストおよび各反応における炭素移動情報は Table S-1 として付録に付す．また各代謝物質の略称も付録に一覧を示す．

2-2-5-8 バイオマス合成フラックスの算出

細胞内では中央代謝系内の中間代謝物質を前駆体として様々な代謝物質が合成される．本研究では中央代謝系内の代謝物質がバイオマス合成に流出するフラックスを算出するために，タンパク質や脂質，核酸といったバイオマス構成成分の合成に対応する前駆体量を先行研究で示される値から算出した (Shastri and Morgan, 2005 ; Table 2-8)．な

お、菌体構成成分は実際には栄養条件によって変化すると考えるのが自然である。バイオマス合成に必要な前駆体量のばらつきが代謝フラックス推定に与える影響を考察した結果を、付録の Fig. S-2 に示す。バイオマス合成フラックスが変動しても、中央代謝系内の代謝フラックス分布の傾向は大きく変わらなかった (Fig. S-2)。

Table 2-8 バイオマス構成成分の合成に必要な前駆体物質の量.

代謝物質	係数 (mol/kg-biomass)
G6P	1.228
3PG	0.208
PEP	1.42
PYR	2.44
AcCoA	3.96
2OG	0.886
OAA	1.14
R5P	0.382
E4P	0.376

2-2-5-9 代謝フラックス解析のアルゴリズム

通常は求める代謝フラックス数に対して、物質収支式と測定可能な代謝フラックス数は少ない。そこで非線形連立方程式の最適解を求めるために、実験的に得られた ^{13}C 標識パターンに対して代謝フラックス分布のフィッティングを行った (Zamboni *et al.*, 2009)。アルゴリズムは Fig. 2-13 に示すように、まず代謝フラックス分布の初期値をランダムに与える。続いてその代謝フラックス分布と指定した ^{13}C 標識 glucose が生み出す各代謝物質の MDV を算出し (MDV_{sim})、実測した MDV_{exp} と比較を行った。比較には以下のように定義する残差二乗和 (SSR ; sum of squared residuals) を算出し、収束の指標とした。

$$\text{SSR} = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\text{MDV}_{\text{exp},i} - \text{MDV}_{\text{sim},i}}{\sigma_i} \right)^2 \quad (24)$$

ここで、 n は測定したアミノ酸の MDV の総要素数である。また σ は 3 回の繰り返し培養における MDV_{exp} の標準偏差を示す。

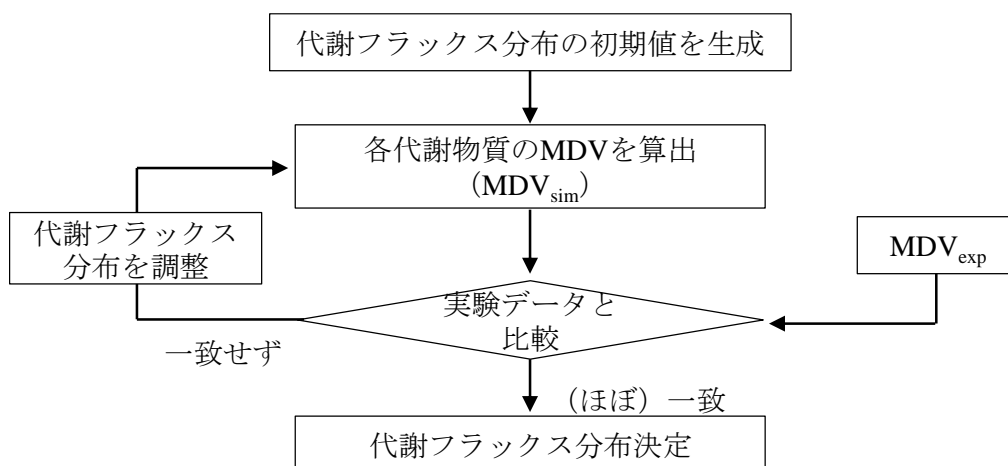


Fig. 2-13 フィッティングのアルゴリズムの概略.

2-2-5-10 代謝フラックスの95%信頼区間算出

代謝フラックスの95%信頼区間は F 分布を用いたグリッドサーチ法によって算出した (Antoniewicz *et al.*, 2006 ; van Winden *et al.*, 2005). これには, 1 反応ずつ代謝フラックスをある値に固定した上で, 残りの代謝フラックスのフィッティングを行う. その上で残差二乗和が以下の式のように F 分布から算出される閾値よりも小さくなる範囲をその代謝フラックス値の95%信頼区間とした (Fig. 2-14).

$$SSR(\mathbf{r})|_{v=v_0} \leq SSR(\hat{\mathbf{r}}) \left(1 + \frac{F_{(1,n-p)}}{n-p}\right) \quad (25)$$

ここで, \mathbf{r} は代謝フラックス分布, $SSR(\mathbf{r})$ は代謝フラックス分布 \mathbf{r} が与える残差二乗和, v は注目している反応の代謝フラックス値, v_0 は v を固定する値, $\hat{\mathbf{r}}$ は SSR が最小値となる代謝フラックス分布, n は測定データ数, p はフィッティングするパラメータ数を表す. 本章では実験データ数 $n=96$ (MDV の自由度) からパラメータ数 $p=18$ (求める代謝フラックス数) を引いた, 自由度 78 の F 分布に基づいて信頼区間を求めた.

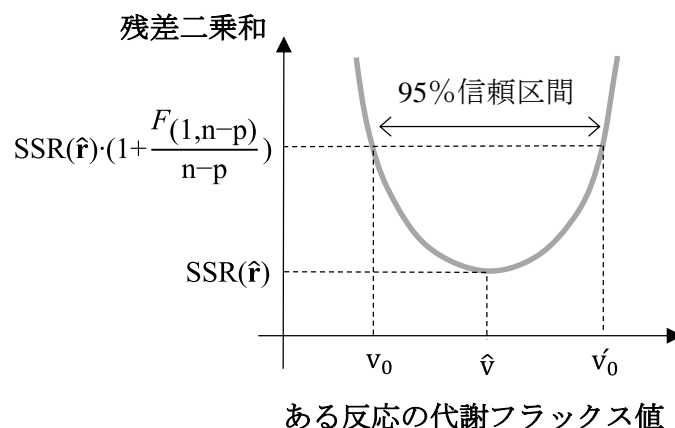


Fig. 2-14 95%信頼区間の算出方法.

2-2-5-11 使用したアプリケーション

本解析には MATLAB 2012b (MathWorks) および代謝フラックス解析ソフトウェア OpenMebius (Kajihata *et al.*, 2014) を使用した。代謝フラックス分布のフィッティングには MATLAB optimization toolbox (MathWorks) で提供される関数 `fmincon` を用いた。

2-2-6 メタボローム分析

メタボローム分析は, Yoshikawa らの研究においてキャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析計 (CE-MS) を用いて行なわれた (Yoshikawa *et al.*, 2013)。

フラスコ培養において指数増殖中の菌体を, 菌体濃度 (OD_{730}) \times 培養液量 (mL) =10 となるようにサンプリングし, 孔径 0.4 μm のメンブレンフィルターを用いて吸引ろ過した。フィルター上の菌体を 10 mL の純水で 2 回洗浄した後, フィルターを内部標準物質として 5 μM camphor-10-sulfonic acid を含んだ 2 mL の methanol に浸すことで代謝反応のクエンチングと細胞内代謝物質の抽出を行い, その後 30 sec の超音波処理を行った。

リン脂質を除去するために, methanol 溶液に 1.6 mL の chloroform と 400 μL の純水を混合し, 30 sec ボルテックス混合し 4600 \times g, 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心処理した。分離後の上層を 5 kDa カットオフフィルター (Millipore) を用いて 9100 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心することでタンパク質を除去した。フロースルーを乾固させた後, 移動時間補正用の内部標準液 (25 μM trimesic acid および 25 μM 3-hydroxynaphtalene-2,7-disulfonic acid) を含んだ 25 μM の水に溶解させ, CE-MS 分析に供した。

CE-MS 分析は Agilent 7100 CE システムおよび Agilent 6224 TOF-MS システム, Agilent 1200 isocratic HPLC pump, G1603A Agilent CE/MS adapter kit, G1607A Agilent CE/MS sprayer kit (Agilent Technologies) を使用した。システム制御とデータ解析には Chemstation software for CE-TOFMS (Agilent Technologies) と MassHunter (Agilent Technologies) を使用した。

アニオン性の代謝物質は fused silica capillary (50 μm i.d. \times 80 cm length) および電解液として anion buffer solution (Human Metabolome Technologies) を用いて, キャピラリー電気泳動によって分離した。サンプルは 50 mbar の圧力で 25 sec 注入し, 印加電圧と泳動圧力は 30 kV および 10-15 mbar にそれぞれ設定した。ESI-MS はネガティブイオンモードで実行し, キャピラリー電圧は 3500 V に設定した。300 $^{\circ}\text{C}$ に加熱された乾燥窒素ガスの流速は 5 psig に維持した。フラグメンタ, スキマー, およびオクタポア電圧はそれぞれ 125, 50, 700 V に設定した。取得した各スペクトルの自動校正は基準物質 (acetate, m/z 59.0139 [$M-H$] $^{-}$) および HDFEP acetate 付加イオン (m/z 680.0355 [$M-H$] $^{-}$) を用いて行った。精密質量データを m/z 50-1,000 の範囲に渡り 1.5 スペクトル/sec で取得した。

methanol 中の各代謝物質プール量の算出には、サンプル分析結果から求められる各代謝物質の内部標準物質に対する相対ピーク面積値と、同時に分析した標準物質ミックスの測定で得られた相対ピーク面積を用いた。この標準溶液はアミノ酸および、解糖系、TCA サイクル、ペントースリン酸経路、カルビンサイクルの中間代謝物質を各 50 μ M で含み、内部標準溶液として 25 μ M methionine sulfone 25 μ M camphor-10-sulfonic acid を含むものである (code H3304-3032, Human Metabolome Technologies)。ピーク面積は MassHunter software for qualitative analysis (Agilent Technologies) を用いて取得した。最終的に、methanol に含まれた代謝物質プール量と細胞の乾燥菌体重量から、菌体重量あたりの代謝物量を算出した。

2-2-7 トランスクリプトーム解析

トランスクリプトーム解析は、Yoshikawa らの先行研究において、Agilent 8 \times 60K platform (Agilent Technologies) 上でカスタムデザインされた *Synechocystis* のマイクロアレイを用いて行われた (Yoshikawa *et al.*, 2013)。このアレイは *Synechocystis* の持つゲノムおよびプラスミド上の各 ORF (open reading frame) に対して約 60 塩基長のプローブを 10 個ずつ持つ。各 ORF のプローブ配列のデザインには、Cyanobase (<http://bactereria.kazusa.or.jp/cyanobase/>) に登録された *Synechocystis* のゲノム情報を基に、Web ツールである eArray (Agilent Technologies) を用いた。

フラスコ培養中の指数増殖中期の培養液を、10% (w/v) の phenol を含む ethanol 等量と混合し、遠心分離により菌体を回収した。回収した菌体は直ちに液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。RNA は Ambion RiboPure Yeast Kit を用いて抽出し、その質を Nanodrop 2000 (Thermo Fischer Scientific) および、Agilent 2100 bioanalyzer と RNA6000 nanoassay kit (Agilent Technologies) を用いて評価した。

Cy3 による cDNA 標識と、ハイブリダイゼーション、洗浄を Fairplay III microarray labeling kit (Agilent Technologies), Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies), および Gene Expression Wash Buffer (Agilent Technologies) を用いて行った。得られた標識 cDNA サンプルは混合栄養条件では 2 分割、従属栄養条件では 3 分割し、DNA マイクロアレイにハイブリダイゼーションさせた。蛍光検出には Agilent G2565CA microarray scanner (Agilent Technologies), Scan control software (Agilent Technologies) および Feature extraction software (Agilent Technologies) を用いた。

データ解析には、各 ORF に対応する 10 プローブの蛍光強度の中央値を発現レベルとして定義した。培養条件間で遺伝子発現レベルを比較するために、全データに対して quantile normalization による正規化を行った。培養条件ごとに 2 もしくは 3 つのデータセットが得られているため、代表値として遺伝子ごとに相乗平均値を算出した。

2-3 結果と考察

2-3-1 glucose の ^{13}C 標識パターンの選択

代謝フラックス解析において、基質の ^{13}C 標識パターンは代謝フラックスの推定精度に影響を与える。代謝フラックスの変化が代謝物質の ^{13}C 標識パターンを変化させやすい場合とそうでない場合が存在するためである。注目する代謝経路の代謝フラックスを精度良く決定するために、適切な ^{13}C 標識パターンの基質を使用しなければならない (Leighty and Antoniewicz, 2012)。本章で解析する混合栄養条件、従属栄養条件にてメタボローム分析およびトランスクリプトーム分析が行われた結果から、従属栄養条件では atrazine の添加によって OPP 経路の代謝フラックスが増大すると推測された (Yoshikawa *et al.*, 2013)。OPP 経路は補酵素 NADPH を合成するため、atrazine による光合成電子伝達の阻害による NADPH 欠乏を緩和すると考えられる。そのため本研究では、OPP 経路の代謝フラックスを精度よく推定できるように glucose の ^{13}C 標識パターンを選択した。

基質の ^{13}C 標識パターンを最適化するには、実際の解析対象に近い代謝フラックス分布を用いてシミュレーションを行う必要がある。Yang らは本研究に近い従属栄養条件と混合栄養条件で *Synechocystis* の代謝フラックス解析を行った結果を報告した (Yang *et al.*, 2012)。そこで Yang らが決定した代謝フラックス分布を用いて、glucose の ^{13}C 標識パターンが OPP 経路の代謝フラックスの 95%信頼区間の大きさに与える影響を確かめた。

本試行では、 $[1-^{13}\text{C}]$ glucose と $[U-^{13}\text{C}]$ glucose の混合比率を 10% ずつ変更した合計 11 通りの組み合わせについて検討を行った (Fig. 2-15)。まず、glucose の ^{13}C 標識パターンごとに、Yang らの研究で算出された代謝フラックス分布に対応するアミノ酸の仮想 MDV データを生成した。続いて仮想 MDV に標準偏差 0.05 のガウシアンノイズを加えた。これは実験誤差を想定したものであり、例えば Jordà らは経験的に 2% の誤差と見積もっている (Jordà *et al.*, 2013) ように、MDV は最大数%程度の誤差を持ちうる。本章のシミュレーションでは 5% の誤差を想定し、最大で 1 となる MDV の要素に対して標準偏差 0.05 のガウシアンノイズを加えた。ノイズを加えた MDV から代謝フラックス分布を推定し直し、OPP 経路について 95%信頼区間を算出した。一連の試行を各 glucose の標識パターンにつき 10 通りのガウシアンノイズを加えて行った結果を Fig. 2-15 に示す。glucose 取り込みフラックス 100 に対して OPP 経路の代謝フラックスが 0 である混合栄養条件では、 $[1-^{13}\text{C}]$ glucose と $[U-^{13}\text{C}]$ glucose を同程度の割合で混合すると代謝フラックスの信頼区間が広がることが分かった。100 の glucose 取り込みフラックスに対して OPP 経路の代謝フラックスが 90 となる従属栄養条件では、逆に、 $[1-^{13}\text{C}]$ glucose や $[U-^{13}\text{C}]$ glucose のどちらかを多く使用する場合に推定精度が非常に悪くなった。混合栄養条件の推定精度を高めると、従属栄養条件の推定精度が低下するというトレードオフが存在する。glucose の ^{13}C 標識パターンを栄養条件ごとに最適化することも可能だが、

本章では2条件で同一の¹³C標識パターンの glucose を用いた。条件間で glucose の¹³C標識パターンを同じにすることで、測定した代謝物質のMDVを比較すれば代謝フラックス分布に差異が生じたか把握できるためである。一方で、2条件で異なる¹³C標識パターンの glucose を用いる場合は、代謝物質のMDVの差が glucose の¹³C標識パターンによるか代謝フラックス分布の差によるかを、代謝フラックスを算出するまでに判断することが容易でない。本章では、従属栄養条件において最も狭い95%信頼区間となった $[1-^{13}\text{C}] : [U-^{13}\text{C}] = 0.7 : 0.3$ という比率を選択した。この比率が、最も2条件の差を捉えやすいと考えたためである。

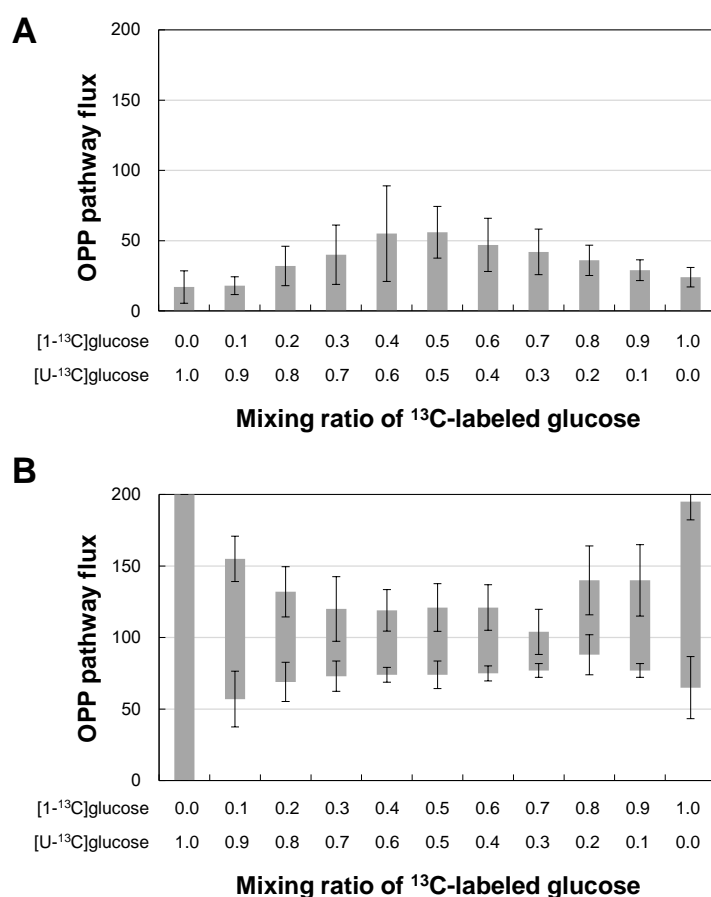


Fig. 2-15 glucose の¹³C標識パターンが OPP 経路の代謝フラックス推定精度に与える影響。

混合栄養条件 (A)、従属栄養条件 (B) について¹³C標識 glucose の各混合比を用いて OPP 経路の 95%信頼区間を求めた。10 通りのノイズを加えた仮想 MDV データから OPP 経路の 95%信頼区間を算出し、その平均値をボックスで、信頼区間の上限および下限の標準偏差をそれぞれエラーバーで示す。代謝フラックスの値は glucose 取り込み速度を 100 として規格化しており、混合栄養条件および従属栄養条件における代謝フラックスの真の値はそれぞれ 0 と 90 である (Yang *et al.*, 2002)。

2-3-2 培養結果

glucose を添加した培地を用いて混合栄養条件での培養を行い、それに atrazine を添加することで従属栄養条件での *Synechocystis* の培養を行った。菌体濃度と glucose 濃度の経時変化を Fig. 2-16 に示す。atrazine の添加によって細胞の比増殖速度は 0.105 1/h から 0.055 1/h に低下した。一方で glucose 比消費速度は 0.53 mmol/gDCW/h から 0.58 mmol/gDCW/h への変化であり、大きな差は見られなかった。*Synechocystis* 細胞の元素分析結果 (Kim *et al.*, 2010) から計算される、取り込み glucose あたりのバイオマスの炭素収率は、1.38 から 0.66 へと atrazine の添加によって減少した。混合栄養条件で炭素収率が 1 を超えているのは、CO₂ 固定と glucose の資化が同時に生じたことを示している。また、atrazine 添加によって構築した従属栄養条件では、炭素収率の低下から、CO₂ 固定が阻害されたことが示唆される。以上より、従属栄養条件では atrazine が *Synechocystis* の光合成代謝に大きな影響を与えたことが分かった。

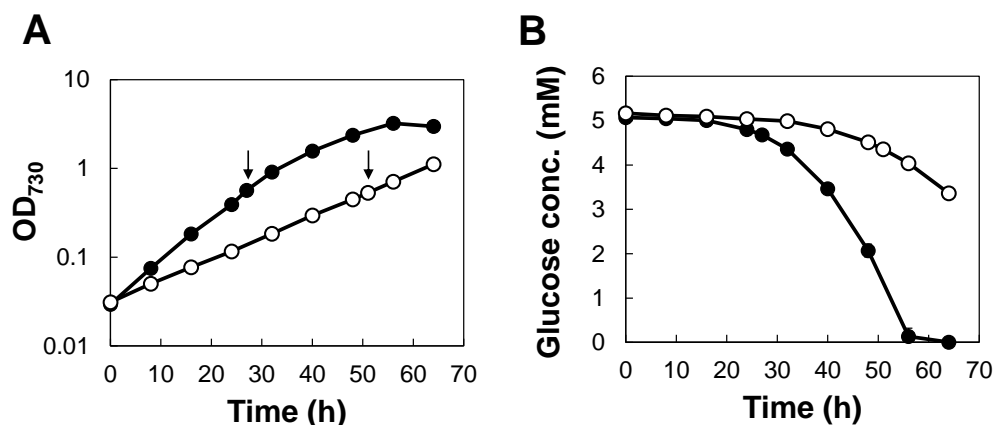


Fig. 2-16 *Synechocystis* の培養プロファイル。

混合栄養条件 (○) と従属栄養条件 (●) における菌体濃度 (A) および glucose 消費 (B) を示す。細胞は連続光の照射下であり、glucose と CO₂ を基質とすることができる。3 回の培養結果の標準偏差をエラーバーとして示すが、多くの場合シンボルの大きさよりも小さくなっている。GC-MS 分析サンプルは図 A 中に矢印で示した時刻で取得した。

2-3-3 ¹³C 標識パターンの測定と代謝フラックスの算出

¹³C 標識 glucose を用いて培養し、指数増殖期において菌体を回収した。続いて、タンパク質構成アミノ酸を菌体加水分解によって取得し、誘導体化後 GC-MS 分析に供し MDV を測定した。その結果、9 種類のアミノ酸の MDV が得られ、2 条件間で差が見られたことから (Fig. S-3), 混合栄養条件と従属栄養条件では代謝フラックス分布に変化が生じたことが推測された。測定したアミノ酸の MDV に最もフィットするように算出した代謝フラックス分布と、その 95% 信頼区間を Fig. 2-17, Table S-2 に示す。信頼区間を考慮すると、中央代謝系の半分以上の経路の代謝フラックスが 2 条件間で有意に変化したことが分かった。特に変化が顕著な代謝反応は、OPP 経路 (混合栄養条件, 0.18-1.41 mmol/gDCW/h ; 従属栄養条件, 1.28-1.41 mmol/gDCW/h) と、Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) 反応 (混合栄養条件, 1.64-1.86 mmol/gDCW/h ; 従属栄養条件, 0.24-0.36 mmol/gDCW/h) であった。

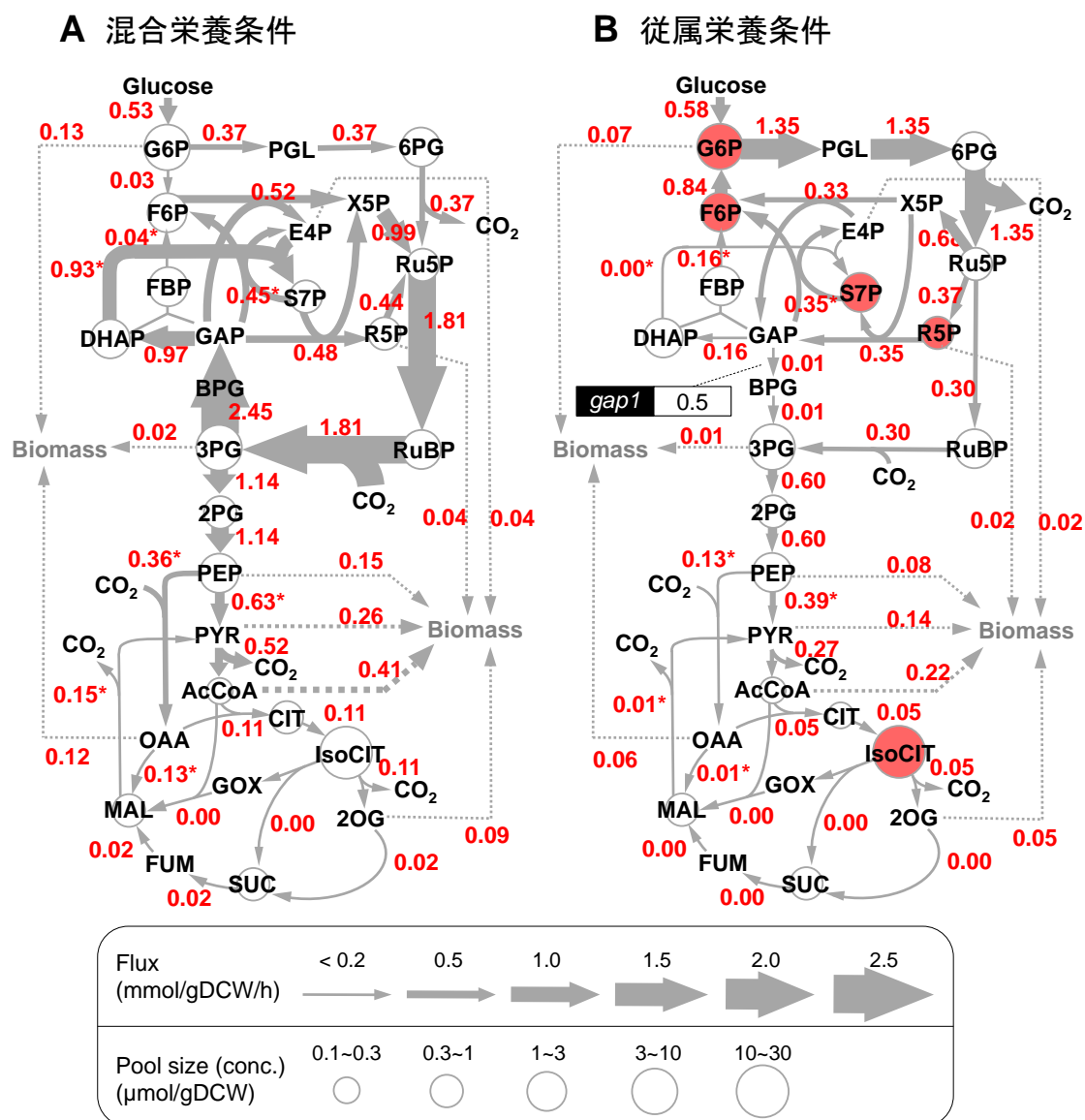


Fig. 2-17 混合栄養条件および従属栄養条件の代謝フラックス分布.

Synechocystis の中央代謝における代謝フラックス分布, メタボロームデータ, 遺伝子発現データを混合栄養条件 (A), および従属栄養条件 (B) についてそれぞれ示す. 赤字はベストフィットの代謝フラックス値を示し (mmol/gDCW/h), 反応の矢印の幅が代謝フラックスの大きさに対応している. アスタリスクは, その反応の代謝フラックスの 95%信頼区間が広いことを示す. 点線はバイオマス合成へ向かう炭素フローである. 代謝物質名に重なる円の大きさはその代謝物質のプール量 (濃度) に対応しており, 従属栄養条件において混合栄養条件と比べて有意な上昇 ($p < 0.05$, 両側 t 検定) が見られたものは赤色で示した. 2条件間において2倍以上の遺伝子発現量の変化が見られた遺伝子は, その遺伝子名と発現量の比を示した. メタボロームデータおよびトランスクリプトームデータは先行研究を引用した (Yoshikawa *et al.*, 2013).

補充経路, リンゴ酸酵素経路, pyruvate kinase (PEP → PYR) 反応から構成される回路, およびペントースリン酸経路の一部については信頼区間が広く, 2条件の代謝フラックスの差を見るのが難しいことが分かった. これらの経路では炭素移動が保存されるループ構造をもっており, 代謝フラックスを精度良く推定することが難しいと考えられる (Fig. 2-18).

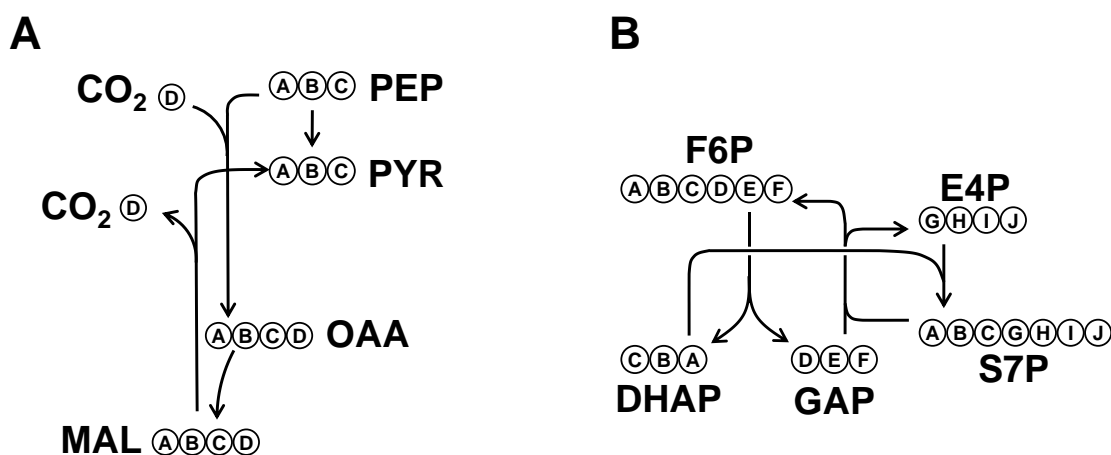


Fig. 2-18 代謝フラックスの信頼区間が広がった代謝経路.

1つの円が1つの炭素原子に相当し, アルファベットによって分子間でどのように炭素原子が引き継がれるかを示している.

2-3-4 混合栄養条件および従属栄養条件での代謝フラックス分布

Fig. 2-17 A に, 混合栄養条件の代謝フラックス分布を, 先行研究で得たメタボロームデータに重ねて示す (Yoshikawa *et al.*, 2013). 代謝フラックス解析結果より, RuBisCO 反応 (1.81 mmol/gDCW/h) が中央代謝系で最も大きな代謝フラックスを持つ反応のひとつであり, ペントースリン酸経路が還元的な方向にフローを持ちカルビンサイクルとして機能したことが分かる. TCA サイクルの代謝フラックス (<0.13 mmol/gDCW/h) は他の代謝経路と比べると小さく, これらの条件ではエネルギー生産より, 菌体構成成分を合成する役割が大きいと考えられる. glucose と CO₂ を同時に資化することは, 混合栄養条件での以前の代謝フラックス解析結果と対応した (Yang *et al.*, 2002). 一方, 本研究で見られた OPP 経路の代謝フラックス値 (0.37 mmol/gDCW/h) は先行研究 (0 mmol/gDCW/h) に比べて大きくなった (Yang *et al.*, 2002). 培養中の光強度が, 本研究 (40 μmol/m²/s) では先行研究 (125 μmol/m²/s) に比べて小さかったことが原因と考えら

れる。光合成の明反応の働きが弱い場合は、減少した NADPH が OPP 経路で補われる。実際に *Synechocystis* の *in silico* シミュレーション結果によれば、混合栄養条件で光強度が小さい場合に OPP 経路がより大きな代謝フラックスを持つことが予測されている (Shastri and Morgan, 2005)。

減少した NADPH を OPP 経路の代謝フラックスを増大させて補うことは、*Synechocystis* の従属栄養条件でも確認された (Fig. 2-17 B)。従属栄養条件は混合栄養条件に光合成阻害剤 atrazine を添加して構築した。atrazine は光化学系 II の D1 タンパクに競合的に結合することで光合成電子伝達を阻害し、ATP および NADPH の生産量を減少させる (Moreland, 1980)。代謝フラックス解析より、atrazine の添加が RuBisCO による CO₂ 固定フラックスを 1/6 に低下させ、OPP 経路の代謝フラックスを 3.6 倍に上昇させたことが分かった。

2-3-5 代謝フラックス解析による不確かな代謝経路の検証

Synechocystis は最も研究の進んだシアノバクテリアであるが、グリオキシル酸経路および TCA サイクルのバイパス経路の存在は明確にされていなかった。

グリオキシル酸経路については、関わる酵素である IsoCIT lyase と MAL synthase の酵素活性が報告されているが (Yang *et al.*, 2002)、これらをコードする遺伝子は特定されていない (Knoop *et al.*, 2010)。改良した測定手法を用いた最近の研究でも、*Synechocystis* は IsoCIT lyase の活性を持ってはいないと報告されている (Knoop *et al.*, 2013)。Fig. 2-17 に示したように代謝フラックス解析結果も、両条件でほとんどグリオキシル酸経路の炭素フローがないことを示しており、*Synechocystis* においてグリオキシル酸経路が機能していないという先行研究を支持している。

シアノバクテリアは 2OG dehydrogenase (IsoCIT → 2OG) と succinyl-CoA synthetase (2OG → succinyl-CoA) を有さず、不完全な TCA サイクルを持つと言われてきた (Pearce *et al.*, 1969)。近年、TCA バイパス経路が *Synechococcus* sp. PCC 7002 で発見され、*Synechocystis* においてもその相同遺伝子が特定された (Zhang and Bryant, 2011)。この TCA バイパス経路は 2OG から SUC の経路の欠失を補完するもので、2OG を SSA に変換する 2OG decarboxylase と SSA を SUC に変換する SSA dehydrogenase からなる。*Synechocystis* のゲノムスケール代謝モデルのシミュレーション結果によれば、TCA バイパス経路は、弱光条件下で glycogen を資化する場合に細胞増殖を促進すると予測された (Knoop *et al.*, 2010)。本章の代謝フラックス解析結果では、95%信頼区間の大きさを考慮すると *Synechocystis* の TCA バイパス経路の存在を裏付けることはできなかった (混合栄養条件, 0.00-0.05 mmol/gDCW/h ; 従属栄養条件, 0.00-0.01 mmol/gDCW/h)。たとえ経路が存在したとしても、その代謝フラックスは非常に小さいと考えられる。

2-3-6 物質生産収率向上に向けた考察

代謝フラックス解析結果から，glucose を資化する栄養条件において，物質生産収率を高めるために有効な代謝改変戦略を考察する。

物質生産収率を高めるには，炭素を目的物質以外の複産物として失わない工夫が必要になる。*Synechocystis* において目的物質と競合するのは，菌体構成成分の合成と，CO₂ の排出である。ここでは，混合栄養条件および従属栄養条件で炭素フローが確認された，CO₂ 排出を伴う OPP 経路に注目する。混合栄養条件および従属栄養条件で，取り込んだ glucose の炭素に対してそれぞれ 12%，39%を OPP 経路で CO₂ として排出した (Fig. 2-17)。そこで，OPP 経路の代謝フラックスを小さくすることで，炭素の利用効率を高められれば目的物質の生産収率向上につながると考えられる。

従属栄養条件では，光合成電子伝達系で生産できない NADPH や ATP を，炭素代謝によって生成する。OPP 経路は菌体合成に必要な NADPH を合成する役割があると考えられる。従属栄養条件では光を照射しないため，OPP 経路の破壊が有効と考えられる。OPP 経路に関わる遺伝子 *zwf*, *devB*, *gnd* のいずれかを破壊することで OPP 経路の炭素フローをなくし，CO₂ の排出ロスを低減できるだろう。特に，*zwf* 破壊株については，先行研究で既に構築可能なことが示されている (Jansén *et al.*, 2010)。Jansén らの研究では，*zwf* 破壊株は光照射をしない従属栄養条件では生育しないことが示されたので，NADPH 合成量の低下によってバイオマス合成も低下し，より高い収率を達成できる可能性がある。一方で連続暗条件や，目的物質生産経路に NADPH が要求される場合は，OPP 経路の破壊は適切な選択肢ではないだろう。Fig. 2-17 の代謝フラックス解析結果によれば，Pgi 反応を破壊することで，OPP 経路を破壊せず，その炭素フローを 60%以上低下させることができる。あるいはその他手法によって OPP 経路の炭素フローを必要な最小量に制御することができれば効果的と考えられる。

混合栄養条件においても OPP 経路の破壊が有効と考えられる。さらに，2-3-4 で述べたように，照射光量の大きさによって OPP 経路の代謝フラックスが変化すると考えられることから，菌体あたりの受光量を大きくすることで OPP 経路における CO₂ のロスを小さくできるだろう。具体的には，光源方向に対する培養液の深度を小さくする，培養液の攪拌速度が十分でない場合大きくする，十分太陽光の強度が大きい地域を選択するなどの対応策が挙げられる。また，人工光を使用する場合は照射光量を大きくすることも有効だろう。

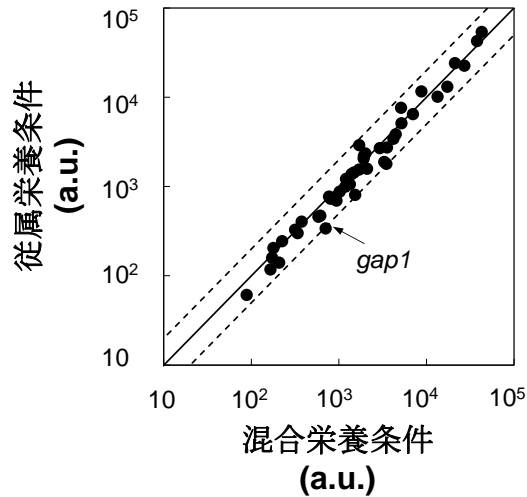
2-3-7 代謝フラックスとメタボローム、トランスクリプトームの統合解析

先行研究で取得されたメタボロームデータおよびトランスクリプトームデータと代謝フラックス解析結果を統合して解析を行った。Fig. 2-19 に各オーム階層における混合栄養条件と従属栄養条件の比較を示す。

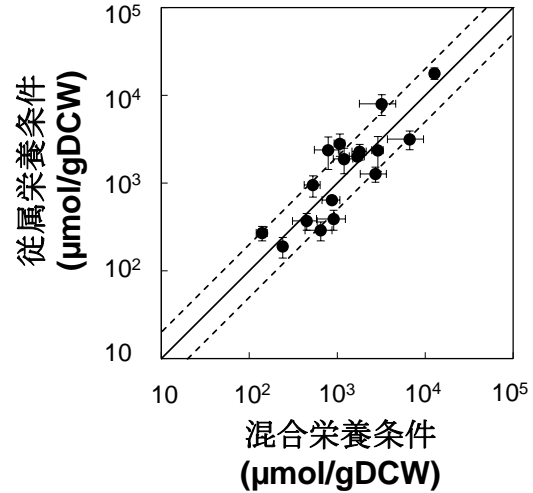
マイクロアレイ分析の誤差は Yoshikawa らの論文で評価されており、同一サンプルの分析で96-99%のデータは0.5-2倍の範囲に含まれることが確認されている (Yoshikawa *et al.*, 2013)。メタボローム分析では、3回の培養結果のばらつきから2条件間の差を評価できる。データ全体について見ると、平均24%、最大で44%の相対標準偏差を持っている。代謝フラックスについては、3回の培養誤差を考慮して95%信頼区間を推定しており、その結果より2条件間で有意な差を確認することができる。さらに、実験誤差によって信頼区間がどのようにばらつくかを考えると、Fig 2-15の結果より、MDVに標準偏差0.05のガウシアンノイズが含まれる場合、OPP経路の代謝フラックスの95%信頼区間範囲のばらつきはの相対標準偏差60%以下であった。代謝フラックスの推定精度は代謝反応ごとに大きく異なるため、一概には言えないが、同一サンプルであればマイクロアレイ分析、メタボローム分析、代謝フラックス解析結果はおおよそ0.5-2倍の範囲に含まれると考えた。

以上を考慮すると、オーム階層間で、代謝フラックスの変化が代謝物質プール量変化および遺伝子発現量変化に比べて大きいことがわかる。ほとんどの遺伝子の発現量変化は2倍以下であり、代謝フラックスの変化が対応する遺伝子の発現量変化に必ずしも直接起因しないことを示している。この節では、2条件間で大きな代謝フラックス変化を見せたいくつかの代謝反応について、各データ間の対応関係を考察する (Fig. 2-20)。

A 遺伝子発現量



B 代謝物質プール量



C 代謝フラックス

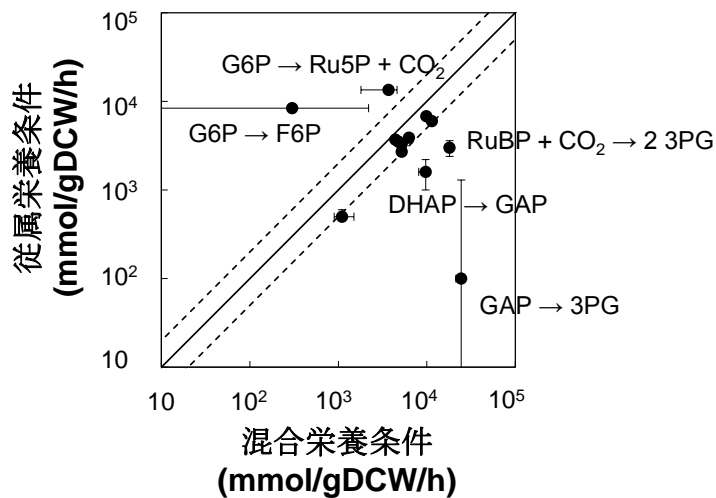


Fig. 2-19 混合栄養条件と従属栄養条件における中央代謝系内の遺伝子発現量 (A) および代謝物質プール量 (B), 代謝フラックス (C) の関係.

破線は各量の2倍の変化量を表す. メタボロームデータおよびトランスクリプトームは先行研究を引用した (Yoshikawa *et al.*, 2013). メタボロームデータのエラーバーは3回の実験の標準偏差を示す. 代謝フラックスについては反応の方向性を考慮せず絶対値を示し, 広い信頼区間をもつ反応 (Table S-2) と, 代謝フラックス値がゼロであった反応はプロットしていない. 代謝フラックスのエラーバーは, 95%信頼区間を表す. 95%信頼区間に0が含まれる反応は図中でエラーバーが大きくプロットされている.

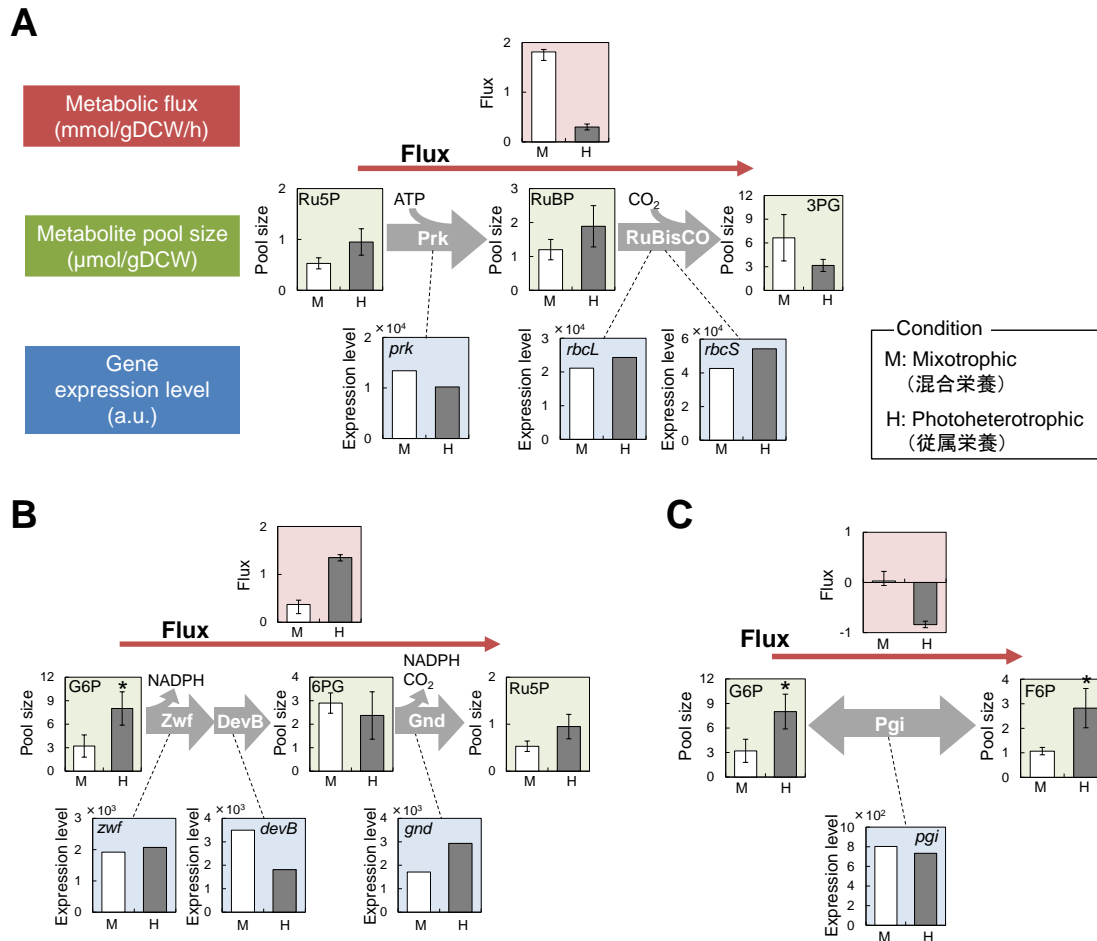


Fig. 2-20 RuBisCO 反応 (A), OPP 経路 (B), Pgi 反応 (C) の近傍における, 代謝フラックスおよび代謝物質プール量, 遺伝子発現量の対応.

代謝フラックスのエラーバーは 95%信頼区間, 代謝物質のエラーバーは 3 回の実験の標準偏差を示す. 遺伝子発現データについては繰り返し測定したデータが得られていない. メタボロームデータおよびトランスクリプトームデータは先行研究を引用した (Yoshikawa *et al.*, 2013). アスタリスクは, 代謝物質プール量において混合栄養条件と従属栄養条件間で有意な変化が見られたことを示す ($p < 0.05$, 両側 t 検定).

RuBisCO 反応に関しては、代謝フラックス、代謝物質プール量、遺伝子発現量のそれぞれの変化に相関は見られなかった (Fig. 2-20 A). Ru5P と RuBP のプール量、および *prk*, *rbcL*, *rbcS* の遺伝子発現量は atrazine の添加で大きく変わっていないのに対して、代謝フラックスは 1/6 に低下した. 以上の結果より、光化学系の阻害が NADPH と ATP 再生産の減少をもたらし、これら補酵素が必要なカルビンサイクルの炭素フローが減少することで RuBisCO 反応の代謝フラックスが低下したと考えられる. カルビンサイクルを酵素レベルで制御する小タンパク CP12 などが知られており (Tamoi *et al.*, 2005), このような翻訳後の制御メカニズムが RuBisCO 反応フラックスの減少に寄与した可能性もある. OPP 経路 (Fig. 2-20 B) および, phosphoglucose isomerase (Pgi) 反応 (Fig. 2-20 C) では, atrazine 添加によって代謝フラックスといくつかの代謝物質プール量が有意に上昇したが、遺伝子発現量は 2 条件間で大きく変化しなかった. 発現量変化は大きくないが, OPP 経路の代謝フラックスは atrazine 添加で 3.6 倍に上昇した (Fig. 2-20 B). 可逆性である Pgi 反応については, 遺伝子発現制御を伴わずに反応の向きが G6P → F6P から F6P → G6P に変化した (Fig. 2-20 C). 以上の結果は, ここで注目した経路において, 対応する遺伝子発現量変化が代謝フラックスの変化に単純に結びついていないことを示している.

Synechocystis の中央代謝系に関わる遺伝子のなかで, GAP を BPG へ変換する GAP dehydrogenase I (GAPDH I) をコードする遺伝子 *gap1* (Koksharova *et al.*, 1998) が, atrazine 添加によって発現量が 1/2 以下となる最も大きな変化を見せた (Fig. 2-19). トランスクリプトーム解析を行った培養条件と代謝フラックス解析を行った培養条件が若干異なるため, 代謝フラックス解析を行った培養条件において *gap1* の遺伝子発現量をリアルタイム定量 RT-PCR (qRT-PCR) によって再確認した. その結果トランスクリプトーム解析結果と同様, *gap1* の遺伝子発現量は atrazine 添加により有意に減少したことが確認できた (Fig. 2-21 ; 両側 t 検定, $p < 0.05$). GAPDH 反応は解糖系中流に位置し, その代謝フラックス変化は, 中央代謝系全体に大きな影響を与えうる. *gap1* の発現量が低下すると, GAP → BPG 反応の代謝フラックスを減少させ, GAPDH 反応上流の代謝物 (G6P, F6P) の蓄積を引き起こし, OPP 経路の代謝フラックスが上昇を引き起こすことができると考えられる. そこで GAPDH 反応が代謝の制御バルブとして働き, より NADPH を生産させるために炭素フローを解糖系から OPP 経路へ向けた可能性が示唆される.

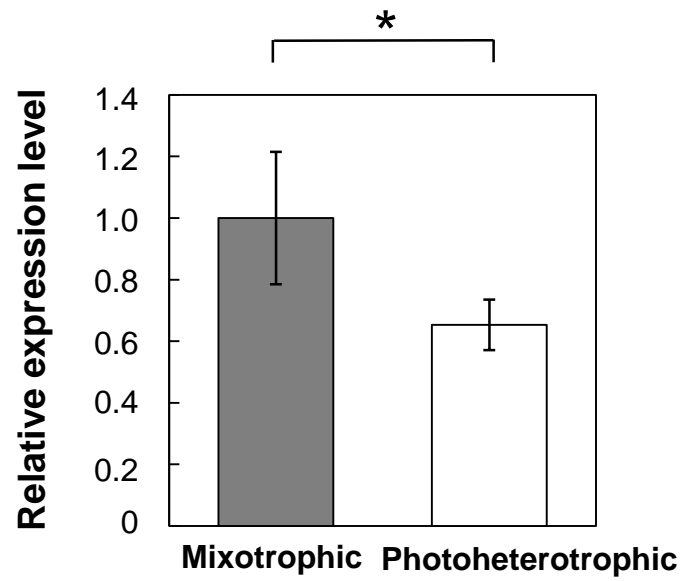


Fig. 2-21 定量逆転写 PCR によって測定した *gap1* 遺伝子発現量.
 遺伝子発現量は混合栄養条件を 1.0 となるように規格化した. エラーバーは 3 回の培養における標準偏差を示す. アスタリスクは 2 条件間において有意な差が見られたことを示す ($p < 0.05$, 両側 t 検定)

2-4 結言

本研究では混合栄養条件と、atrazine によって光合成が阻害された従属栄養条件において *Synechocystis* の ^{13}C 代謝フラックス解析を行い、両条件の代謝フラックス分布の変化を明らかにした。代謝フラックス解析結果より物質生産収率向上に向けた代謝改変戦略を議論し、さらに代謝フラックス、メタボローム、トランスクリプトームのデータを比較することで、オーム階層間の関連と代謝変化のメカニズムを考察した。

まず、代謝フラックス解析の推定精度を向上させるために ^{13}C 標識実験のデザインの最適化を行った。注目した OPP 経路の代謝フラックス推定精度を高めるように glucose の ^{13}C 標識パターンを選択した。代謝フラックス解析の結果、9 種類のタンパク質由来アミノ酸の ^{13}C 標識パターンから 2 栄養条件間の代謝フラックス分布の有意な差を明らかとした。また存在が不明瞭だったグリオキシル酸経路や TCA バイパス経路の存在の有無について検討を行った結果、本研究で解析した培養条件ではこれらの経路に炭素フローが存在するとは言えず、経路が存在しないか、存在しても本解析条件では機能していないと結論付けた。

代謝フラックス解析の結果、 CO_2 と glucose が利用可能な混合栄養条件では、glucose の取り込みと同時にカルビンサイクルが大きな代謝フラックスを持つことが分かった。一方で、従属栄養条件では atrazine による光合成電子伝達の阻害が RuBisCO の代謝フラックスの大幅な低下を引き起こしたことが確認された。さらに従属栄養条件では OPP 経路の炭素フローがカルビンサイクルの一部を逆流し、再び OPP 経路へ炭素を供給するサイクルを形成したことが分かった。atrazine は光合成の電子伝達を阻害し、光合成明反応における NADPH 生産および ATP 生産を減少させる。OPP 経路は NADPH を生産することから、光合成阻害で不足した NADPH を補ったと考えられる。本研究では以上のように、混合栄養条件と従属栄養条件の代謝フラックス分布を解析することができ、2 条件間でカルビンサイクルの逆流を含む大きな代謝再編がなされたことが明らかとなった。

また、推定した代謝フラックス分布より、物質生産収率を高めるための代謝改変について考察を行った。生産収率を高めるには、固定した炭素のロスを低減することが重要である。OPP 経路は NADPH を合成するとともに CO_2 を排出する代謝経路であり、解析した 2 栄養条件では、OPP 経路の大きな代謝フラックスが炭素収率を低下させる要因となる。そこで、OPP 経路に関わる遺伝子の破壊や、混合栄養条件では菌体の受光量を大きくすることが効果的と考えられる。

本研究ではさらに、先行研究で取得されていたメタボロームデータ、トランスクリプトームデータと代謝フラックス分布を比較した。その結果 2 条件間で代謝フラックス分布には大きな変化が見られたのに対し、代謝物質プール量は変化が小さく、遺伝子発現量はほとんど変化していないことが分かった。よって、代謝反応のフラックス変化は必

ずしも対応する酵素遺伝子の発現量変化によって制御されているのではないことが示唆された。代謝物質プール量の変化から代謝フラックスの変化を推測することも困難であると考えられる。すなわち、各代謝経路の炭素フローを推定するには¹³C代謝フラックス解析を実施することが重要であり、メタボローム分析やトランスクリプトーム分析を単独で行うことは有効でない場合が存在することが示された。さらに、代謝フラックス解析結果とトランスクリプトーム解析結果から、従属および混合栄養条件間の大きな代謝変化は *gap1* 遺伝子が起点になって生じた可能性があると考えた。*gap1* 遺伝子は GAP を BPG に変換する酵素をコードする遺伝子であり、この遺伝子発現量は atrazine 添加で有意に低下することが確認された。*gap1* の遺伝子発現低下により従属栄養条件では解糖系のフローが遮断され、OPP 経路を通過した炭素が再び解糖系上流に向かう (F6P → G6P) ことで OPP 経路の代謝フラックスが大きくなったと考えられる。代謝フラックス解析を含む複数のオミクスデータの統合解析は、今回示されたように代謝変動の制御機構を絞り込むのに有効な解析手法であると思われる。

3章 ^{13}C 標識 CO_2 を用いた光独立栄養条件の解析

3-1 緒言

シアノバクテリアは、植物と同じ酸素発生型の光合成を行うバクテリアであり、光をエネルギー源として、 CO_2 を炭素源として用いて光独立栄養生育が可能である。シアノバクテリア細胞において、光エネルギーの化学エネルギーへの変換と、 CO_2 の固定は独立して制御されている。光エネルギーはチラコイド膜上の光化学系によって捕捉され、光合成電子伝達と呼ばれる一連のプロセスを経て、ATP や NADPH という高エネルギー分子や還元力運搬体が生成される。一方で、光合成による CO_2 固定には RuBisCO 反応を含む複数の代謝反応からなる炭素固定サイクル（カルビンサイクルまたは還元型ペントースリン酸回路）が関わっている。光独立栄養条件では細胞は光量、温度、 CO_2 濃度、その他の栄養源の利用可能度（N, P, S など）といった環境変化の中で代謝を制御しながら生育している（Aguirre von Wobeser *et al.*, 2011 ; Kim *et al.*, 2010）。

シアノバクテリアは CO_2 から様々な物質を合成する能力を有しているため、細胞を反応器として有用化合物を生産させるという試みが進められている。第1章に述べたように、アルコールや有機酸等の化合物がシアノバクテリアを用いて CO_2 から合成できることが実証されている。目的物質の生産収率を高めるには、取り込んだ炭素をより目的物質に振り分けなければならない（Melis, 2013）。そこで、光独立栄養条件における細胞内の炭素フローを把握するために代謝フラックスを測定することが重要である。各代謝フラックスを測定できれば、実際の細胞の代謝状態と、目的物質の生産収率を高める理想的な代謝状態のギャップを明らかにでき、続く代謝の改変戦略を明確にできる。シアノバクテリアを用いた CO_2 からの物質生産に有効な代謝改変戦略として、計算機シミュレーションによる研究などが報告されている（Vu *et al.*, 2013; Yoshikawa *et al.*, 2011）。一方で光独立栄養条件に適用可能な代謝フラックス解析法は構築されていなかった。そのため目指すべき炭素フローを設計できたとしても、現状の代謝フラックス分布が明らかでなく、有効な代謝改変法を見出すことが難しかった。

第2章では glucose を資化する栄養条件に注目し、 ^{13}C 標識 glucose を用いた同位体的定常状態における代謝フラックス解析を行った。この手法では代謝状態を定常に保ち ^{13}C 標識実験を行うことで、代謝フラックス分布を反映したパターンに各代謝物質を ^{13}C 標識することができる。そこで同位体的定常状態において測定した代謝物質の ^{13}C 標識パターンから、代謝フラックスを推定した。一方で、本章で解析する光独立栄養条件では、1炭素分子である CO_2 を単一炭素源とするため、同位体的定常状態における解析で代謝フラックスを推定することができない。 ^{13}C 標識 CO_2 を用いた培養では、同位体的定常状態において細胞内の全ての炭素が CO_2 と同一割合で ^{13}C 標識され、代謝物質の

^{13}C 標識パターンが代謝フラックスを反映しなくなるためである。そこで、代謝物質の ^{13}C 標識パターンの変化過程が代謝フラックスと代謝物質プール量に依存する関係に注目し、代謝物質の ^{13}C 標識パターンの動的な変化から代謝フラックスおよび代謝物質プール量を推定する。この同位体的非定常状態における解析手法には、 ^{13}C 標識実験系や分析技術を新しく準備する必要がある、それらは同位体的定常状態における代謝フラックス解析で用いたものよりも難易度が高くなる。細胞内の代謝反応速度は速く、中間代謝物質の迅速な ^{13}C 標識パターンの時間変化を捉える必要がある。また、分析対象とする中間代謝物質は構造が不安定かつ細胞内に微量しか存在せず、分析が難しい。本章では、培養液に適切に ^{13}C を導入する方法、短時間間隔で連続的に中間代謝物質の ^{13}C 標識パターンの測定を行う方法を構築し、光独立栄養条件における *Synechocystis* の代謝フラックス解析法の開発を目指した。光独立栄養条件において細胞がどのように炭素を分配しているかを明らかにし、 CO_2 を基にした物質生産において生産収率を向上するために、どのような代謝改変が有効であるかを議論する。

3-2 実験材料と実験方法

3-2-1 同位体的非定常状態における代謝フラックス解析

3-2-1-1 解析原理

^{13}C 標識実験を行い、 ^{13}C 標識パターンが定常に至るまでの動的な過程から代謝フラックスを算出する原理を説明する。Fig. 3-1 に概要を示すように、培養中に、基質である CO_2 を ^{13}C 標識 CO_2 に切り替えると、 CO_2 固定反応より順番に細胞内の代謝物質は ^{13}C 標識されていく。

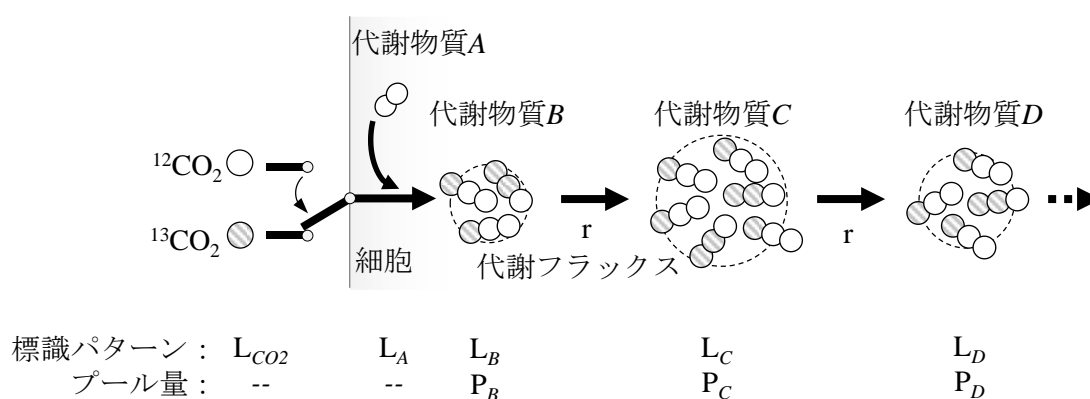


Fig. 3-1 ^{13}C 標識実験のイメージ図.

この一連の過程を記述するためには、(1) 代謝物質の ^{13}C 標識パターン、(2) 代謝物質のプール量（細胞内濃度）、(3) 反応の代謝フラックス値の3つの量が必要となる。代謝物質の ^{13}C 標識パターンのみは時間的に変化する量であり、その変化のしかたは代謝フラックスおよびプール量に影響を受ける。この関係は以下のような連立微分方程式で表現される。

$$\frac{dL_B}{dt} = \frac{r}{P_B} (L_{\text{CO}_2} \times L_A - L_B) \quad (26)$$

$$\frac{dL_C}{dt} = \frac{r}{P_C} (L_B - L_C) \quad (27)$$

$$\frac{dL_D}{dt} = \frac{r}{P_D} (L_C - L_D) \quad (28)$$

ここで、標識パターン L およびプール量 P の一部は測定可能である。そのため、実測したこれらの値に対応するようにフィッティングすることで代謝フラックス分布および代謝物質プール量を推定する。

本解析における実験の手順としては、未標識の CO_2 を用いて細胞を培養し、ある時刻

に ^{13}C 標識 CO_2 へと基質を切り替える. その瞬間から反復的に菌体を回収し, ^{13}C 標識パターンの時間変化を捉える. また合わせて代謝物質のプール量を測定しておくことが必要となる.

3-2-1-2 動的な ^{13}C 標識過程のモデル化

本章の解析には EMU を用いず, 代謝物質の IDV をベースに標識過程のモデル化を行った.

IDV による代謝反応の記述

代謝反応による代謝物質間での IDV の要素の移動は isotopomer mapping matrix (IMM) を用いて表現する. 例として PYR から AcCoA への反応を示す (Fig. 3-2). IDV_{PYR} は要素数 8 のベクトルであり, $\text{IDV}_{\text{AcCoA}}$ は要素数 4 ($=2^2$) のベクトルである. $\text{IMM}_{\text{PYR} \rightarrow \text{AcCoA}}$ は IDV_{PYR} の各要素が $\text{IDV}_{\text{AcCoA}}$ のどの要素に移動するかを示している.

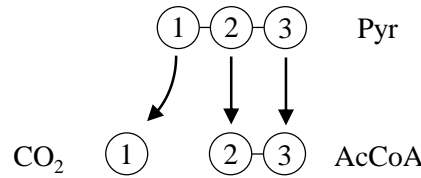


Fig. 3-2 PYR から AcCoA に引き継がれる炭素原子.

PYR の 1-3 位の炭素のうち, 2-3 位の炭素が AcCoA に引き継がれる.

$$\text{IDV}_{\text{AcCoA}} = \text{IMM}_{\text{PYR} \rightarrow \text{AcCoA}} \times \text{IDV}_{\text{PYR}} \quad (29)$$

$$\begin{pmatrix} \text{IDV}_{\text{AcCoA}}[00] \\ \text{IDV}_{\text{AcCoA}}[01] \\ \text{IDV}_{\text{AcCoA}}[10] \\ \text{IDV}_{\text{AcCoA}}[11] \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} \text{IDV}_{\text{PYR}}[000] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[001] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[010] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[011] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[100] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[101] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[110] \\ \text{IDV}_{\text{PYR}}[111] \end{pmatrix} \quad (30)$$

よって, 3-2-1-1 で示した式(26)-(28)は, 正確には以下のように記述される.

$$\frac{dL_B}{dt} = \frac{r}{P_B} ((\text{IMM}_{\text{CO}_2 \rightarrow B} \cdot \text{IDV}_{\text{CO}_2}) \times (\text{IMM}_{A \rightarrow B} \cdot \text{IDV}_A) - \text{IDV}_B) \quad (31)$$

$$\frac{dL_C}{dt} = \frac{r}{P_C} (\text{IMM}_{B \rightarrow C} \cdot \text{IDV}_B - \text{IDV}_C) \quad (32)$$

$$\frac{dL_D}{dt} = \frac{r}{P_D} (\text{IMM}_{C \rightarrow D} \cdot \text{IDV}_C - \text{IDV}_D) \quad (33)$$

ただし, \times は行列の要素同士の積を表す.

3-2-1-3 ¹³C 標識パターンの経時変化シミュレーション

連立微分方程式で表される各代謝物質の ¹³C 標識パターンの経時変化は、オイラー法を用いて数値解析的に算出した。以下に、原理を説明する。以下のような形で表される微分方程式において、

$$\frac{dx}{dt} = f(x) \quad (34)$$

微分の定義より、更新幅 h が十分小さい場合は以下のように近似できる。

$$\frac{dx}{dt} = \lim_{h \rightarrow 0} \frac{x(t+h) - x(t)}{h} \approx \frac{x(t+h) - x(t)}{h} \quad (35)$$

よって、次のように表現することが可能になる。

$$\frac{x(t+h) - x(t)}{h} = f(x) \quad (36)$$

$$x(t+h) = x(t) + f(x) \cdot h \quad (37)$$

計算機を用いて x に初期値を与え、更新幅 h を微小にとり連続的に更新していくことで近似的に x の時間発展を得ることができる。

3-2-1-4 代謝物質のプール量の扱い

代謝物質プール量は可能な限り実測を試みた。しかし、代謝物質の抽出時のロスや、分析におけるイオンサプレッション効果等により、本質的に正確な定量は難しい。そこで代謝物質プール量はフィッティングパラメータとして扱った。代謝物質 A , B , C があるとすると、推定するプール量 P_{sim} は以下のように、そのプール量の実測値 P_{exp} に対してそれぞれ α の変動を加え、その後プールサイズ全体を β の倍率で変動させた。

$$\begin{aligned} P_{A,sim} &= (P_{A,exp} + \alpha_A) \cdot \beta \\ P_{B,sim} &= (P_{B,exp} + \alpha_B) \cdot \beta \\ P_{C,sim} &= (P_{C,exp} + \alpha_C) \cdot \beta \end{aligned} \quad (38)$$

変数 α によって各物質の定量値の不正確さおよび代謝モデル中で省略した代謝物質の影響を補完でき、また代謝物質の抽出効率が悪かった場合は β でそれを一律に補正できるという考えである。フィッティングではこれら α , β をパラメータとした。

3-2-1-5 天然同位体比の補正方法

中間代謝物質の ¹³C 標識パターンの測定を行う液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) 分析では、予め組み立てた多重反応モニタリングのメソッドにより測定対象を選択した。測定対象イオン数と分析感度はトレードオフの関係にあり、本実験

の分析メソッドでは測定対象イオン数の増加を抑えるために、炭素数 n 質量数 M の化合物については質量電荷比 $m/z = M \sim M+n$ のイオンを対象とした。そのため、余分にスペクトルをとった生の MDV に補正行列を掛けるという手法 (2-2-5-6) で天然同位体比の補正を行うことができない。本章では、推定した MDV に天然同位体比を加えてから実測値との比較を行った。

2-2-5-6 と同様に `formate` を例として説明すると、まず式(39)に示すように MDV のシミュレーション値 MDV_{sim} に、骨格炭素以外の原子に存在する天然同位体比を加えることで実際に観測されうる MDV_{sim_corr} を算出する。

$$MDV_{sim_corr} = \begin{bmatrix} M_0^* \\ M_1^* \\ M_2^* \\ M_3^* \\ M_4^* \\ M_5^* \\ M_6^* \\ M_7^* \end{bmatrix} = [H] \cdot [O] \cdot MDV_{sim} \quad (39)$$

一方、`formate` の分子量を M とすると、質量毎の存在量は質量 M , $M+1$ のものしか実測できない。そのため以下のように、2要素のみで規格化を行った。

$$MDV_{exp} = \begin{bmatrix} Abundance_M_0 / (Abundance_M_0 + Abundance_M_0) \\ Abundance_M_1 / (Abundance_M_1 + Abundance_M_1) \end{bmatrix} \quad (40)$$

MDV_{sim_corr} に天然同位体比を加えた $MDV_{sim_corr'}$ についても同様に規格化を行った。

$$MDV_{sim_corr'} = \begin{bmatrix} M_0^* / (M_0^* + M_1^*) \\ M_1^* / (M_0^* + M_1^*) \end{bmatrix} \quad (41)$$

3-2-1-6 代謝モデル

本解析には、Fig. 3-3, Table S-3 に示す代謝モデルを使用した。このモデルには第2章にて考察した結果を踏まえて、グリオキシル酸経路および TCA バイパス経路を含めた。また、第2章の代謝モデルと比較すると、`glucose` の取り込み反応は存在せず、`FBP`, `6PG`, `RuBP`, `Asp` といった ^{13}C 標識パターンやプール量を測定できた代謝物質を追加した点が異なる。また本モデルでは、`2PG` と `3PG` をまとめて“`PGA`”として扱う、`CIT` と `IsoCIT` をまとめて“`IsoCIT`”として扱うといった簡略化を行った。代謝物質のプール量は、例えば `PGA` の場合は `2PG` と `3PG` のプール量の合計として扱った。

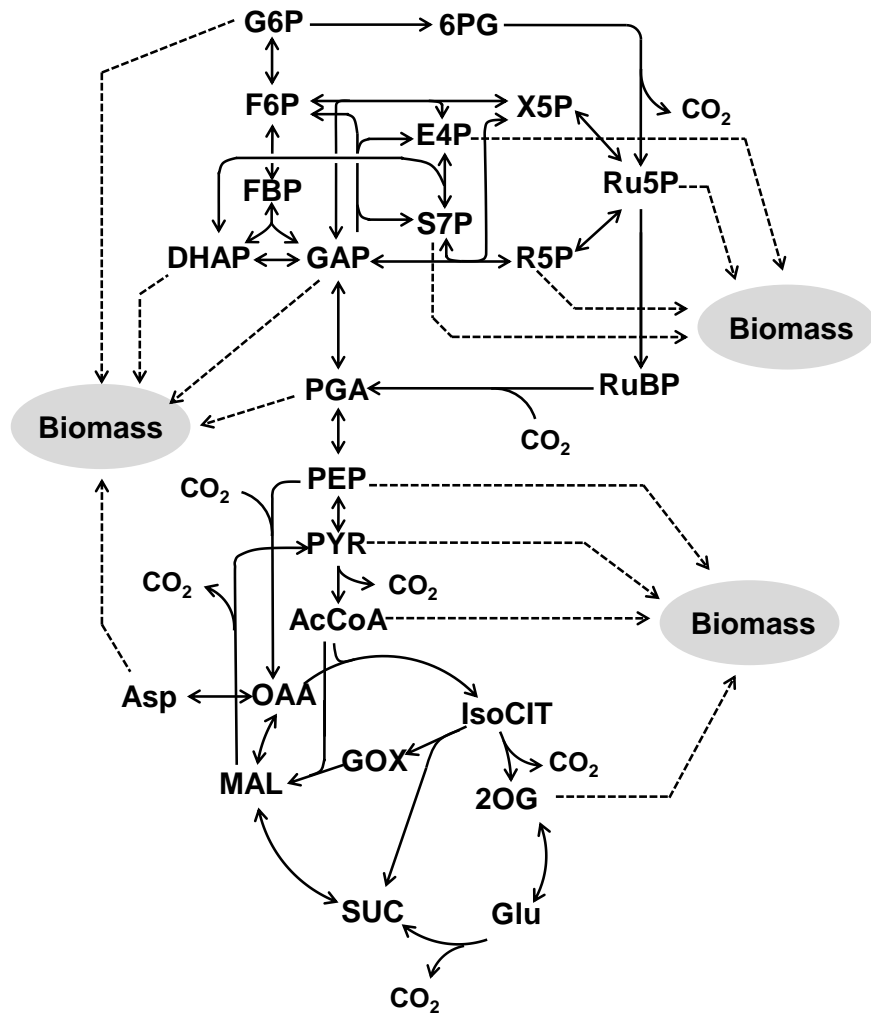


Fig. 3-3 本解析に使用した中央代謝モデル.

一方向の矢印は不可逆反応，両方向の矢印は可逆反応を示す．点線の矢印はバイオマス合成経路である．

3-2-1-7 バイオマス合成フラックスの算出

光独立栄養条件でのバイオマス合成フラックスの算出には，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るシミュレーションを用いた (Yoshikawa *et al.*, 2011). フラックスバランス解析を用いることで，与えた環境条件における量論的に最大な増殖速度 (バイオマス合成速度) と，そのときの代謝フラックス分布を算出することができる．そこで増殖速度が本研究で実測された 0.091 1/h となる光量の入力値を設定し，その際の代謝フラックス分布を算出した．Table 3-1 にその代謝フラックス値を示す．

Table 3-1 バイオマス合成フラックス.

代謝物質	代謝フラックス (mmol/gDCW/h)
G6P	0.075
GAP	0.002
PGA	0.081
PEP	0.083
PYR	0.114
AcCoA	0.333
Ru5P	0.001
R5P	0.071
E4P	0.039
S7P	0.001
2OG	0.076
OAA	0.121

3-2-1-8 代謝フラックス算出のアルゴリズム

本研究では、実測した代謝物質の MDV の変化に対して、代謝フラックス分布および代謝物質の細胞内プール量をパラメータとして進化的アルゴリズムを用いたフィッティングを行った。アルゴリズムは Fig. 3-4 に示すように、まず代謝フラックスおよびプール量の初期値をランダムに複数セット生成した。CO₂ の MDV を入力し、各代謝物質の IDV の経時変化をオイラー法によりシミュレートした。実測した代謝物質の MDV_{exp} と比較するため、シミュレートした IDV を MDV に変換した上で、天然同位体比補正を行った (MDV_{sim})。比較の評価関数には以下に定義する残差二乗和を用い、フィッティングの収束の指標とした。

$$SSR = \sum_{j=1}^t \sum_{i=1}^n \left(\frac{MDV_{exp,i,j} - MDV_{sim,i,j}}{\sigma_{i,j}} \right)^2 \quad (42)$$

ここで、 t は測定したタイムポイント数、 n は測定した代謝物質の MDV の総要素数である。 σ は測定した MDV_{exp} の標準偏差を入力する。本実験において MDV の測定は 1 回ずつであり、標準偏差を正しく評価できないため SD は一律で 1 とした。評価関数である SSR が大きい場合は、相対的に良い残差を与えたパラメータセットを抽出し、それぞれに複数通りのノイズを加えて残差二乗和を再評価するという操作を繰り返した。

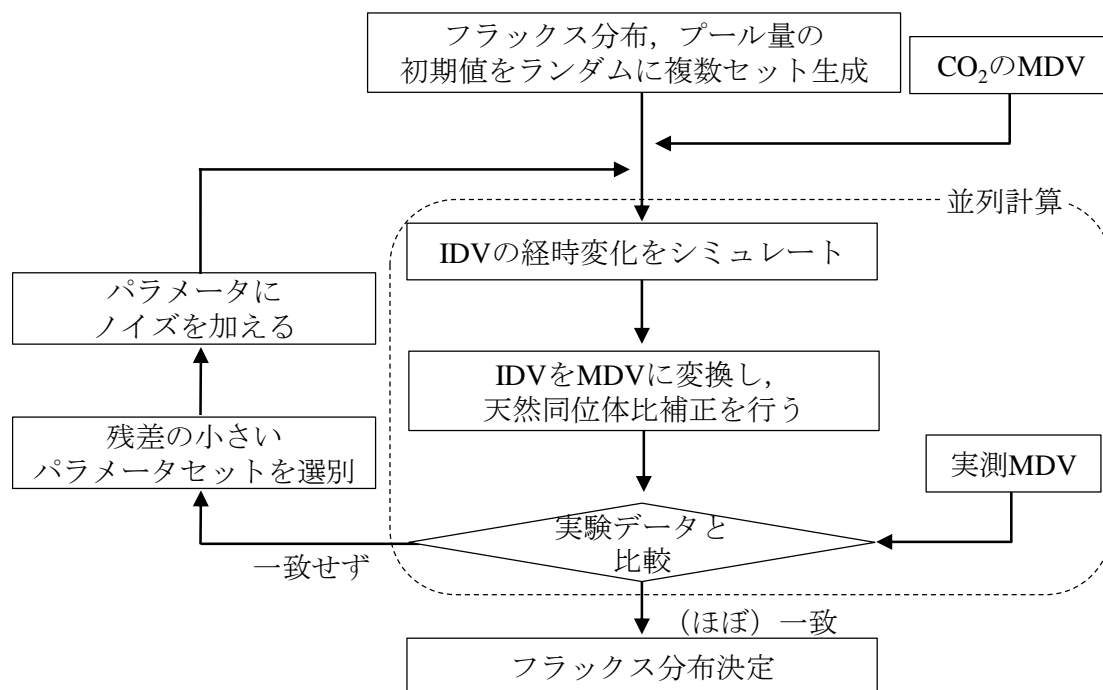


Fig. 3-4 フィッティングアルゴリズムの概略.

使用した進化的アルゴリズムでは、1つのパラメータセットを1個体とみなし、複数の個体からなる集団を用いる。解探索の各反復において、各個体のパラメータにそれぞれ乱数を付加し（変異）、確率的により良い解を探索する。変異が加えられた個体を用いて残差二乗和を算出し、集団内から残差二乗和が小さい個体を選別する（淘汰）。この反復を繰り返すことで、解を探索する。Table 3-2 に、本章で使用した進化的アルゴリズムの条件を示す。

各反復において、 ^{13}C 標識パターンのシミュレーションと残差二乗和の算出は、個体ごとに分割して並列計算を行うことで計算時間を短縮した (Fig. 3-4)。並列計算には、MatLab Parallel Computing Toolbox (MathWorks) を使用した。

Table 3-2 進化的アルゴリズムの条件.

項目	設定
集団における個体数	500
変異率	代謝フラックス 1%
	代謝物質プール量 10%
	プール量の倍率 10%
各反復における選択個体数	25
変異体数	各個体に対して 20

3-2-2 培養操作

前培養は、500 mL 三角フラスコを用いて、100 mL の改変 BG11 培地を用いて行った。培養装置として BR-43FL (タイテック) を用いて、34°C, 150 rpm, 白色 LED 光 (LC-LED 450 W, タイテック) を約 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ の光強度で照射することにより振盪培養を行った。

本培養は平板型フォトバイオリアクター (Fig. 3-5) を用いて行った。培地は 1.4 L とし、前培養から *Synechocystis* を OD₇₃₀ が約 0.03 となるように植菌した。温度は 34°C, 攪拌速度は 200 rpm とし、光強度はリアクター表面で約 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ となるように両側の LED パネルから連続光を照射した。通気ガスは N₂/O₂ 混合ガス (N₂: 79.3%, O₂: 20.7%) に CO₂ ガスを約 2.5% 混合し、1 vvm の速度で通気した。リアクターには 1N HCl と 1N KOH を接続し、培養液の pH が 7.5 となるように制御した。培養中は pH, 排気 O₂ 濃度, 排気 CO₂ 濃度, 溶存 CO₂ 濃度 (DCO₂) をモニタリングした。

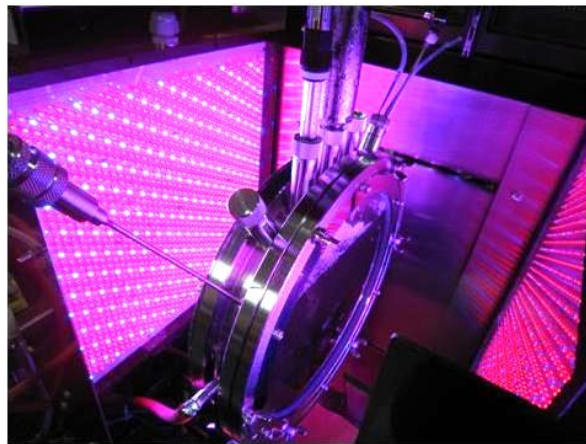


Fig. 3-5 平板型フォトバイオリアクター。

シアノバクテリアの培養のためにカスタムメイドされたもので、菌体自身による遮光の影響を小さくするために厚みの薄い平板構造となっている。リアクターの両サイドから LED パネルにより光照射を行う。LED パネルは 660 nm と 475 nm の単色光を発する素子からなり、その比率はおよそ 5:1 である。

3-2-3 ¹³C 標識実験

指数増殖中期 (OD₇₃₀ \approx 0.6) に CO₂ 通気のみを停止し、0.83 M の ¹³C 標識 Na₂CO₃ (Cambridge Isotope Laboratories) 水溶液 20 mL を添加した (Fig. 3-6)。¹³C 標識炭酸塩の添加以降 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30 min 後にサンプリングを行い、GC-MS, CE-MS, LC-MS/MS 用のサンプルを取得した。また、予め ¹³C の添加前にも 1 回サンプリングを行い、これを時刻 0 min のサンプルとした。

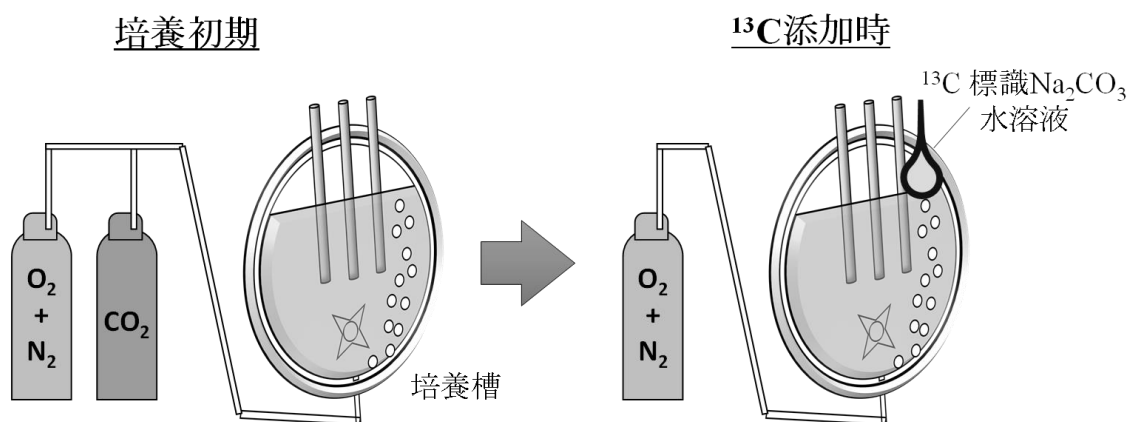


Fig. 3-6 ^{13}C 標識実験系.

培養初期は、 CO_2 ガスの通気を行った。 ^{13}C 標識炭酸水溶液によって培養系内に ^{13}C を添加した。 ^{13}C 添加後は培養系内の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比を変化させないように CO_2 ガスの供給は停止した。

3-2-4 サンプルング手法

3-2-4-1 サンプルング概要

本実験では GC-MS, CE-MS, LC-MS/MS の 3 種類の質量分析計を使用するために、それぞれのサンプルを取得した。分析対象は中央代謝系内の中間代謝物質であり、これらが ^{13}C で標識されていく過程を捉えるために短時間間隔の連続サンプル取得を行った。 ^{13}C 標識 Na_2CO_3 添加以前に時刻 0 min に相当する未標識サンプルを取得し、添加後、1, 2, 3, 5, 10, 20, 30 min 後にサンプルングを行った。

器具の数と工程の簡略化を考慮し、処理工程の違いによって GC-MS 分析用のサンプルを取得する系列と、CE-MS および LC-MS/MS 分析用のサンプルの取得する系列に分けた (Fig. 3-7)。それぞれ必要な菌体量を採取し吸引ろ過した後、菌体の付着したフィルターを methanol に浸すことで、代謝のクエンチングと菌体内容物の抽出を行った。以上の操作は、煩雑であるため、複数人による分担作業とした。培養液の回収に 2 人、2 系列のクエンチングおよび抽出作業に合計 2 人、CE-MS および LC-MS/MS サンプルの超音波処理に 1 人、抽出後のサンプルをフリーザーに運搬する役割に 1 名の合計 7 人で行った。

3-2-4-2 GC-MS 分析用サンプルの取得方法

サンプリングには 50 mL シリンジ (SS-50ESZ, テルモ) を用い、菌体濃度 (OD_{730}) × 培養液量 (mL) = 25 となるように必要な菌体量を取得した。フィルトレーションには、3 連フィルターマニホールド (IWAKI), 循環式アスピレーター (PSA152AB, ADVANTEC), 減圧ろ過用フィルターホルダー (KGS-90, ADVANTEC), フィルター (PTFE タイプメンブレンフィルター H100A090C, ADVANTEC) を用い Fig. 3-7 のように組み立て、使用した。培養液を吸引ろ過し菌体を回収した後、50 mL 遠沈管に予め入れておいた 1.6 mL の methanol にフィルターごと浸し、速やかに -80°C フリーザーに保存した。処理が終了した後は、フィルターホルダー、ピンセットなどを洗い、新しいフィルターをセットすることで続くサンプリングの準備をした。この系では培養液の回収から methanol 抽出までを 20 sec 程度で行った。

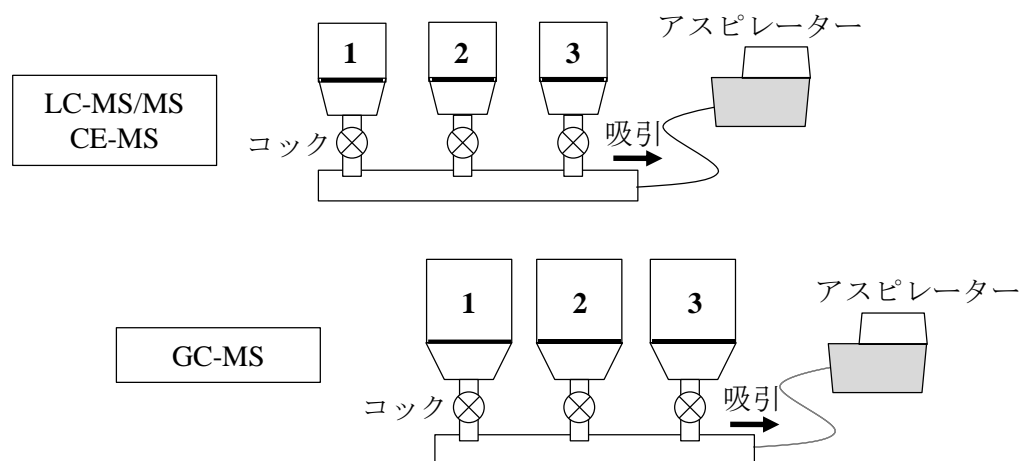


Fig. 3-7 サンプリング装置.

3 連のフィルターユニットで番号に示すように順番に培養液のフィルトレーションを行った。LC-MS/MS および CE-MS 分析サンプルを取得する系列、GC-MS 分析サンプルを取得する系列に分けた。使用時は吸引力を変化させないように 2 つ以上のコックを同時にオープンにしないようにした。

3-2-4-3 CE-MS および LC-MS/MS 分析用サンプルの取得方法

菌体の回収方法は GC-MS 用サンプルの場合と基本的に同じだが、培養液の回収量を菌体濃度 (OD_{730}) × 培養液量 (mL) = 20 とした。サンプリング装置で GC-MS の場合と異なるのはフィルター (Isopore Membrane Filter HTTP 0.4 μm pore 47 mm diameter 04700, Millipore) およびフィルターホルダー (6163-4701, 柴田科学) である。培養液を吸引ろ過した後、10 mL の純水で 2 回菌体を洗った。内部標準溶液 1 (H3304-1002, Human Metabolome Technologies) を 5 μM となるように予め添加した 4 mL の methanol を密閉シャーレ (5-067-21, アズワン) に分注しておき、そこにフィルターを浸した。シャー

レに蓋をして超音波洗浄器 (USC-6D, IWAKI) により 30 sec 処理し, 抽出液を 2 本の 15 mL 遠沈管に 2 mL ずつ回収し, -80°C フリーザーで保存した.

このサンプリングでは菌体を純水で洗浄するために所要時間が長くなり, 培養液の回収から methanol 抽出まで 60 sec 程度を要した.

3-2-5 GC-MS 分析による中間代謝物質の ^{13}C 標識パターンの分析

3-2-5-1 サンプル調製

サンプリング後-80°C で保存していた methanol 抽出液に, 純水 540 μL , chloroform 1.6 mL, 0.1 mM ribitol 100 μL を添加した. 1 min ボルテックス混合し, フィルターごと溶液を 15 mL 遠沈管に移した. 1 min 超音波処理した後, 1 min ボルテックス混合し, スイングロータを用いて 4,500 rpm, 40 min, 4°C で遠心処理した. 溶液の上層 1.6 mL を 2 mL 容マイクロチューブにとり, 遠心エバポレータ (SAVANT SPD1010, Thermo Scientific) により 45°C で乾燥させた. サンプルを純水 200 μL に溶解させ, 6 min ボルテックス混合の後 15,000 rpm, 5 min, 4°C で遠心処理した. 上清をマイクロチューブにとり遠心エバポレータにより 45°C で乾固させた.

3-2-5-2 誘導体化

乾燥させたサンプルに 40 mg/mL methoxyamine hydrochloride in pyridine 20 μL を添加し, 30°C で 90 min 攪拌した (DeepWellMaximizer M BR-022UP, タイテック). MSTFA+1% TMCS (Thermo Scientific) を 180 μL さらに添加し, 37°C で 30 min 攪拌した. 室温で 2 h クーリングを行った後, 15,000 rpm, 5 min, 4°C で遠心処理を行い, 上清を GC-MS 分析に用いた.

ここで methoxyamine hydrochloride によるオキシム化は以下のように起こり, カルボニル基が修飾される (Fig. 3-8).

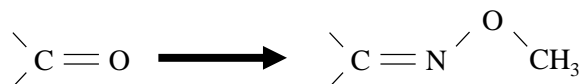


Fig. 3-8 methoxyamine hydrochloride によるオキシム化反応.

また MSTFA による TMS (trimethylsilyl) 化反応は以下のように反応し, カルボキシル基およびヒドロキシル基が修飾される (Fig. 3-9).

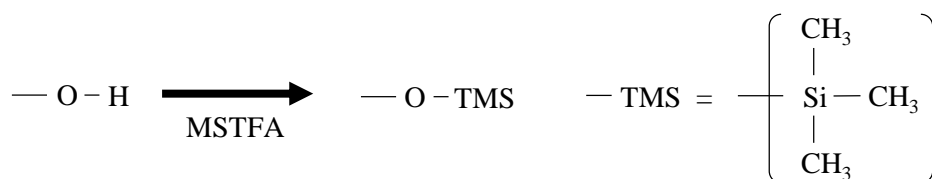


Fig. 3-9 MSTFA による TMS 化反応.

3-2-5-3 分析

GC-MS 分析には 2-2-5-3 に示したものと同一環境を用いた。オープン温度は始め 60°C で 1 min 保ち、その後 10°C/min で昇音させ 325°C で 10 min 保持させた。インターフェース温度は 250°C、イオン源温度は 250°C、インジェクション量は 1 μL でスプリット比は 1:10、選択イオンモニタリングモードで分析を行った。

3-2-6 LC-MS/MS 分析による中間代謝物質の ¹³C 標識パターンの分析

3-2-6-1 サンプル調製

サンプリング後-80°C で保存していた methanol 抽出液に、純水 640 μL, chloroform 1.6 mL を添加した。30 sec ボルテックス混合し 4,600×g, 4°C, 5 min で遠心処理した。溶液上層を 6 本の限外ろ過フィルター (UltrafreeMC-PLHCC 250/pk for Metabolome Analysis, Millipore) に移し、9,100×g, 4°C で遠心処理した。サンプルを遠心エバポレータにより室温で減圧乾燥させた。サンプルを、終濃度 25 μM となるように内部標準溶液 3 (H3304-1004, Human Metabolome Technologies) を添加した純水 25 μL に溶解させ、1 本のマイクロチューブにまとめた後、再び室温で減圧乾燥させた。乾固させたサンプルを 50 μL の純水に溶解させ、バイアル瓶に挿入したガラスインサートに移した。

3-2-6-2 分析

LC-MS/MS 分析は Agilent 1200 (Agilent Technologies) および Agilent 6460 (Agilent Technologies) を用い、カラムは Unison UK-C18 (1.5 m UK-C18, Imtakt) を用いた。移動相としては溶出液 A (15 mM tributylamine, 10 mM acetate) と溶出液 B (methanol) を用いて、Table 3-3 に示すようにグラジエントをかけた。カラム温度は 35°C、注入量は 3 μL とした。MS の条件はガス温度 300°C、ガス流速 10 L/min、ネブライザ 55 psi、シーズガス温度 380 度、シーズガス流速 11 L/min、キャピラリー電圧は 3,500 V、ノズル電圧は 1,000 V とした。

Table 3-3 グラジエントのパターン.

時間 (min)	溶出液 A (%)	溶出液 B (%)
0.0	100	0
24.0	10	90
24.1	100	0
30	100	0

3-2-7 CE-MS 分析による細胞内代謝物質プール量の定量

サンプリング後-80°C で保存していた methanol 抽出液に、純水 640 μ L, chloroform 1.6 mL を添加した。30 sec ボルテックス混合し 4,600 \times g, 4°C, 5 min で遠心処理した。溶液上層を 6 本の限外ろ過フィルター (UltrafreeMC-PLHCC 250/pk for Metabolome Analysis, Millopore) に移し、9,100 \times g, 4°C で遠心処理した。サンプルを遠心エバポレータにより室温で減圧乾燥させた。サンプル全量を、終濃度 25 μ M となるように内部標準溶液 3 (H3304-1004, Human Metabolome Technologies) を添加した純水 25 μ L に溶解させ、分析に供した。分析は 2-2-6 に記述した方法で行った。

3-3 結果と考察

3-3-1 培養結果

本実験では、フォトバイオリアクターを用いて照射下で 2.5%の CO₂ 通気により *Synechocystis* を光独立栄養条件で培養した。培養曲線を Fig. 3-10 に示す。この培養条件において *Synechocystis* は指数増殖を見せ、比増殖速度は 0.091 1/h であった。

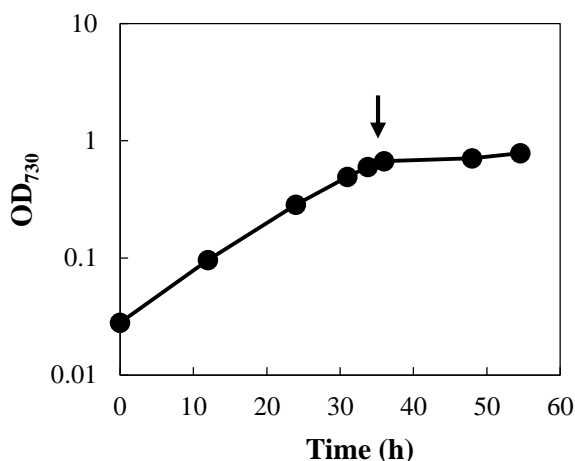


Fig. 3-10 菌体濃度の経時変化。

図中に矢印で示した時刻に ¹³C を添加し、代謝フラックス解析を行った。

光独立栄養生育中の細胞の代謝フラックスを解析するために、OD₇₃₀ ≈ 0.6 となった培養時刻 33.8 h に ¹³C 標識 Na₂CO₃ を添加し、¹³C 標識実験を開始した。同時に CO₂ ガスの通気を停止し、以降の通気は N₂/O₂ 混合ガスのみとした。さらにこの瞬間より連続サンプリングを開始し、¹³C 添加後 30 min までサンプルを取得した。Fig. 3-11 に ¹³C 標識炭酸の投入による pH、排気ガス組成、溶存 CO₂ 濃度の変化を示す。Na₂CO₃ 水溶液の投入により、培養液の pH が一時的に大きく変動したが、その後 pH 調整剤の添加により設定値である 7.5 に維持された。¹³C の添加以降は培養系内へ炭酸分子種の供給がなされないため、培養槽内のヘッドスペースの CO₂ 濃度は低下していった。さらに、培養液内の CO₃²⁻、HCO₃⁻ は気相中の CO₂ 濃度と平衡を保とうとするため、ヘッドスペースの CO₂ 分圧の減少とともに炭酸イオンは CO₂ となって流出していった。Fig. 3-11 より、サンプリングを行った 30 min までの範囲では培養液は 1% 以上の高炭酸濃度を維持できていたことが分かる。そのため、標識実験の前後で細胞は常に高炭酸環境下に保つことができたと考えられる。その後培養液中の炭酸は 1.5 h ほどで枯渇し (Fig. 3-11)、細胞の増殖は停止した (Fig. 3-10)。

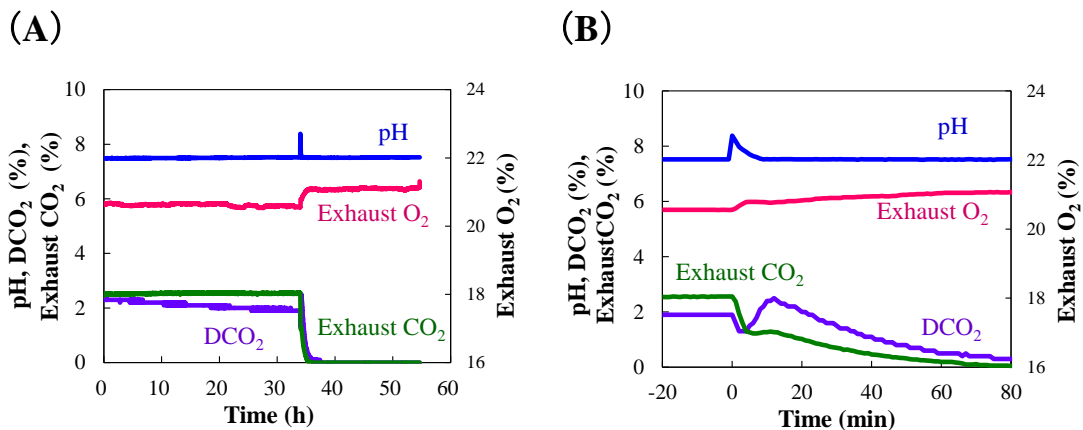


Fig. 3-11 培養パラメータの経時変化.

培養全時間の経過 (A), ¹³C 標識 Na₂CO₃ 添加時の拡大図 (B) を示す. (B) では ¹³C 添加を時刻 0 min とした.

以上の ¹³C 標識実験を行うにあたり, 考慮した事項について記述する. 本実験では未標識の CO₂ で培養中の細胞に対して ¹³C 添加を行った. ¹³C 添加自体により代謝状態が変化することを抑えるために, 培養全体を通して炭酸の供給を行い, 常に培養液を高炭酸濃度に保った. また培地中の CO₂ の ¹³C/¹²C 比の変化は瞬間的に完了する必要があり, 以降はその比を一定に保たなければならない. そのため培地への ¹³C 標識炭酸水溶液の添加を行い, 同時に未標識 CO₂ ガスの通気の遮断を行った. ¹³C 添加量が少ないと, 細胞内代謝物質の ¹³C 標識パターンの変化が小さくなるため, 培地に含まれる未標識の炭酸分子種の濃度に対して, 添加する ¹³C 標識 Na₂CO₃ 量が大きくなるように考慮した.

3-3-2 ¹³C 標識パターンの測定結果

細胞内の代謝物質が ¹³C 標識されていく過程を捉えるために, 培養液に ¹³C 標識 Na₂CO₃ 添加した後, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30 min と ¹³C 添加前 (0 min 相当) にサンプリングを行った. 菌体抽出物サンプルを GC-MS, CE-MS, LC-MS/MS による分析に供し, 代謝物質および代謝物質のフラグメントの ¹³C 標識パターン (MDV) を測定した. その測定結果を以下に示し, 得られた結果について考察した.

GC-MS 分析では PGA と PEP の MDV を測定した (Fig. 3-12). 本実験の GC-MS 分析では, イオン化の際に代謝物質の断片化 (フラグメンテーション) が起こる. PGA のフラグメントイオンの MDV も Fig. 3-12 に併せて示す. PGA のフラグメントイオンは, 3 炭素分子である PGA の骨格炭素間の結合が解離したものであり, ¹³C 標識パターンの位置情報を一部取得することができた.

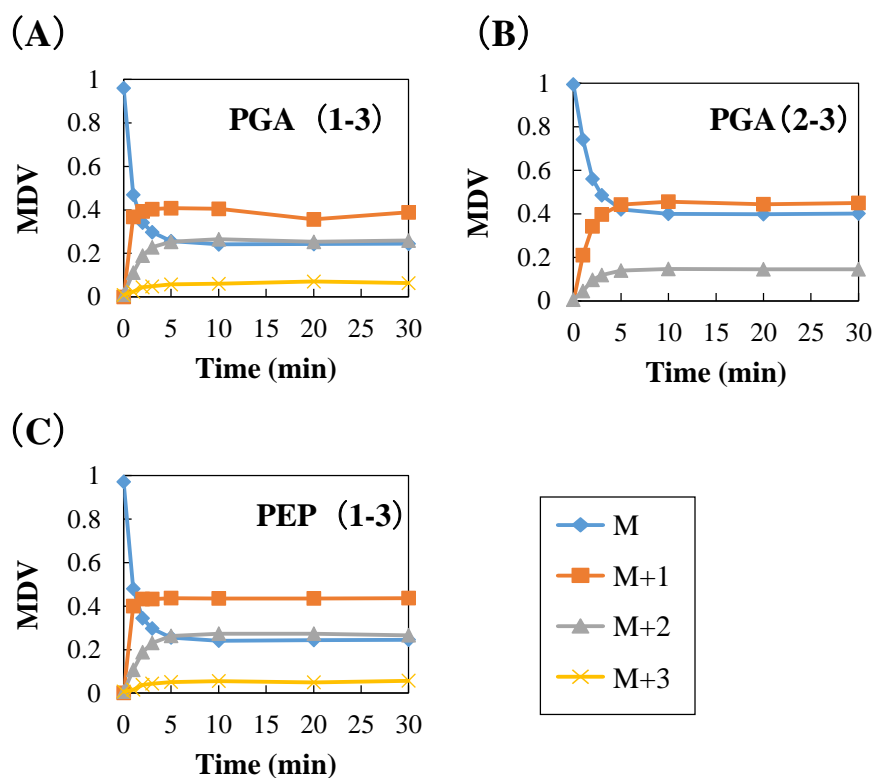


Fig. 3-12 GC-MS 分析により測定した MDV.

PGA の 1-3 位の骨格炭素の MDV (A), PGA の 2-3 位の骨格炭素の MDV (B), PEP の 1-3 位の骨格炭素の MDV (C) を示す. 横軸は ^{13}C 標識 Na_2CO_3 の添加以降の時刻である. ただし時刻 0 min のデータは ^{13}C 添加前に測定した. なおここに示す GC-MS データは 2-2-5-6 に示した手法で骨格炭素以外の原子について天然同位体比を補正してある.

LC-MS/MS 分析では, 解糖系, OPP 経路, カルビンサイクル, TCA サイクルにおける中間代謝物質, および遊離アミノ酸の一部を観測対象とした. 測定した各物質の MDV の経時変化を Fig. 3-13 に示す. LC-MS/MS 分析では, 3 連四重極の衝突室においてフラグメンテーションが起こりうる. 本実験では F6P, 2OG, SUC, Asp について, 炭素間結合が解離したプロダクトイオンを観測することができた. 細胞内の存在量が多い代謝物質については分析強度が十分であるが, そうでない物質についてはノイズが大きい (Fig. 3-13).

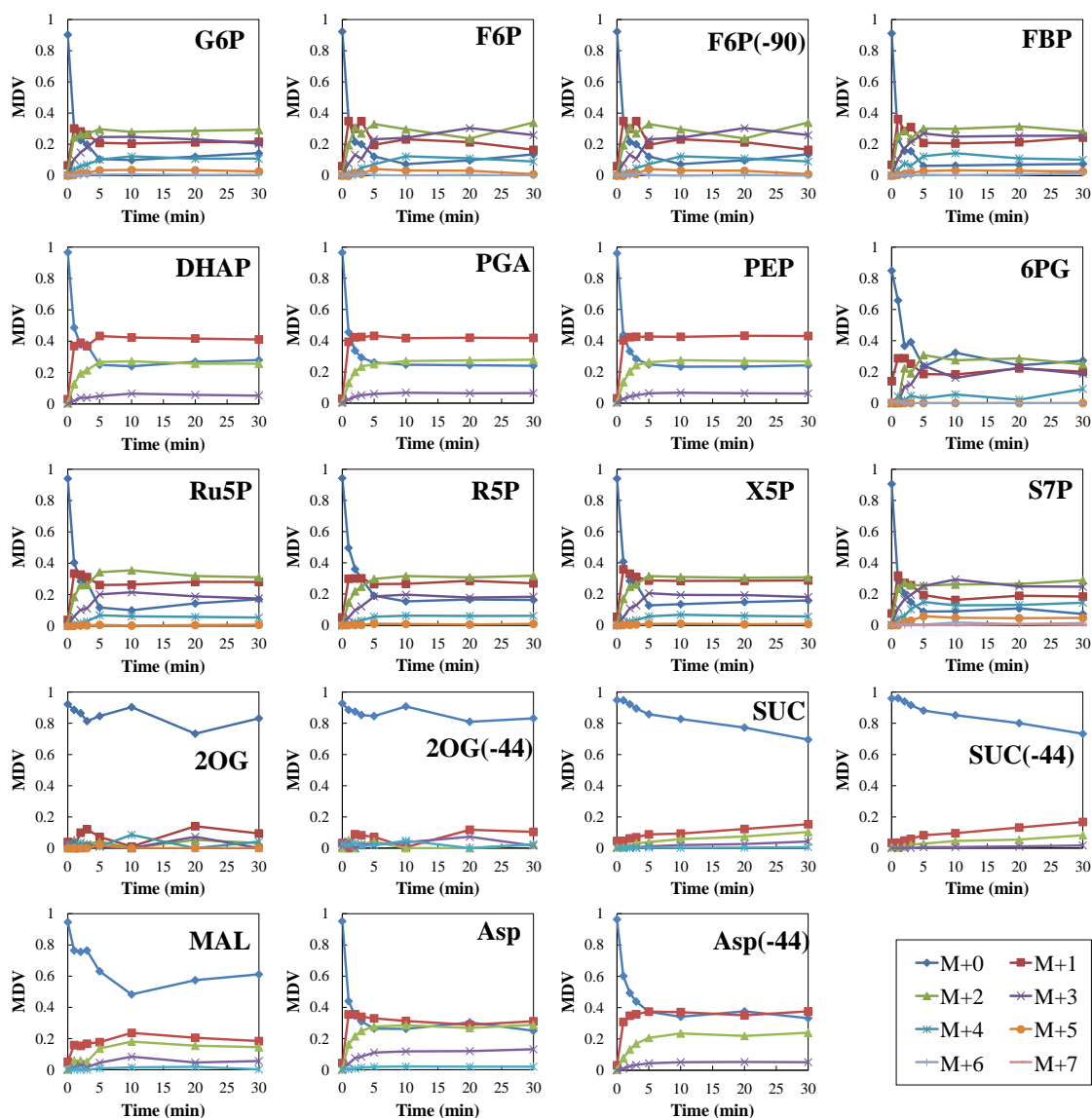


Fig. 3-13 LC-MS/MS 分析により測定した MDV データ。

横軸は ^{13}C 標識 Na_2CO_3 の添加以降の時刻である。時刻 0 min のデータは ^{13}C 添加前に測定した。各グラフ内に代謝物質名を示す。また代謝物質名に括弧書きの数字が付されている場合は、その代謝物質の骨格炭素間で断片化したプロダクトイオンを示し、数字は解離した構造の質量を示す。しかし多くの場合プロダクトイオンが代謝物質分子のどの炭素から構成されるかは不明である。LC-MS/MS 分析ではの天然同位体比補正に必要なデータが取得できておらず (3-2-1-5 参照)、ここに示す MDV データは骨格炭素以外の原子についても天然同位体比を補正していない。

測定した各代謝物質の MDV の経時変化は、代謝経路の構造や、代謝フラックスの情報を含んでいる。各代謝物質はそれぞれ異なる炭素数を持つため、代謝物質間の比較を明確にするために各代謝物質の平均 ^{13}C 濃縮度を算出した (Fig. 3-14)。これによって炭素数や、炭素の ^{13}C 標識の位置情報の影響を除去し、各代謝物質について炭素が ^{13}C で標識されている単純な割合を知ることができる。

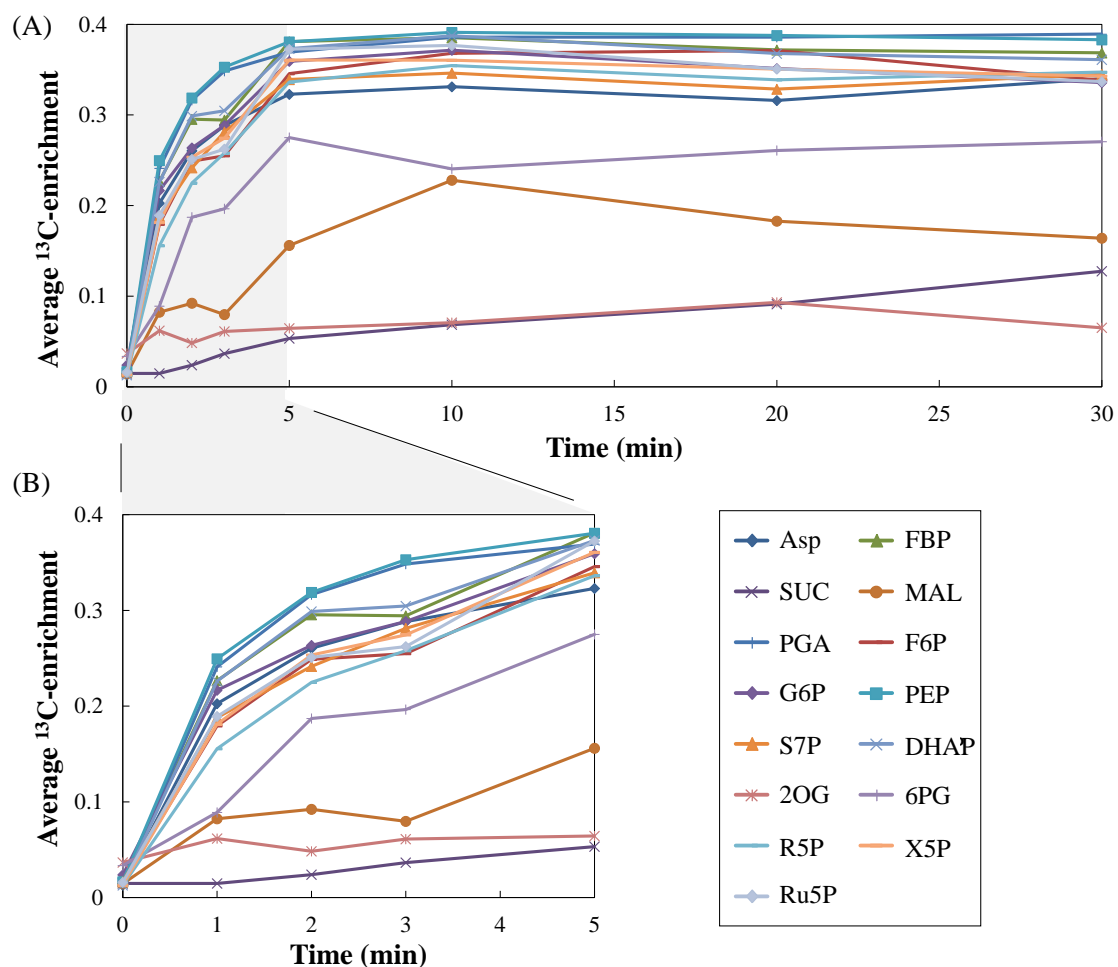


Fig. 3-14 各代謝物質の平均 ^{13}C 濃縮度の経時変化。

各代謝物質の持つ炭素が平均してどの割合で ^{13}C 標識されているかを示す。炭素数 n の代謝物について、平均 ^{13}C 濃縮度 = $1/n \cdot \sum_{i=1}^n (\text{MDV}[i] \times i)$ で算出される。 ^{13}C 標識 Na_2CO_3 添加後 30 min までの全サンプリングポイントの結果 (A), ^{13}C 導入後 5 min までの結果を拡大して示す (B)。本データは全て LC-MS/MS 分析結果を基に算出され、天然同位体比を補正していない。

Fig. 3-14 より、多くの代謝物質の ^{13}C 標識パターンは ^{13}C 添加後 1 min 以内に大きく変化し、10 min 以内に定常に達したことが確認できた。最も速く標識されたのは RuBisCO による CO_2 固定反応の生成物である PGA と、PGA と代謝マップ上で近い PEP である (Fig. 3-3)。続いて解糖系の代謝物質 (DHAP, FBP, G6P) が標識された。カルビンサイクルが機能しているためペントースリン酸経路の代謝物質 (Ru5P, R5P, X5P, S7P) も比較的速く標識されている。それに続いて OPP 経路の中間体である 6PG が標識されており、これより、OPP 経路の炭素フローも若干存在することが示唆される。中央代謝系の下流については 2OG, SUC, MAL, Asp が測定できている。SUC の標識は最も遅く、2OG や MAL よりも遅れて標識された。また OAA から 1 反応で合成される Asp の標識速度は TCA サイクルの他の代謝物質に比べて速い。これは PEP carboxylase によって PEP から OAA を合成する補充反応の寄与だと考えられる。Asp は PGA から 3 反応で合成されるため合成経路が短いほか、PEP carboxylase による補充反応自体が CO_2 固定を伴うため、さらに平均 ^{13}C 濃縮度を高めたと考えられる。

本実験では ^{13}C 標識炭酸水の添加により培養系内の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ を瞬間的に高めたが、培養液中の炭酸および CO_2 の標識パターンは測定できていない。炭酸の ^{13}C 標識パターンに関する情報は、GC-MS 分析によって得られた PGA のフラグメント情報が参考になる。測定した PGA の 2 種類のフラグメントは、それぞれ 3 炭素化合物である PGA の 1-3 位の炭素、2-3 位の炭素からなる。これら 2 つのフラグメントの MDV データより、PGA の 1 位炭素の MDV が算出できる。PGA の 1 位炭素は、RuBisCO によって固定された炭素原子が新たに配置されるポジションである (Fig. 3-15)。そこで PGA の 1 位炭素の MDV に注目すれば、 ^{13}C 標識 Na_2CO_3 添加後の培養系内の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比を求められると考えた。

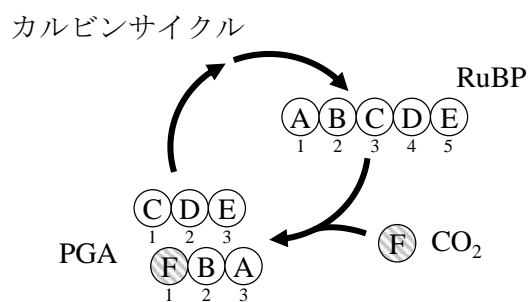


Fig. 3-15 RuBisCO による CO_2 固定反応における炭素原子の移動。

各分子の炭素を位置番号は左から 1,2,...位となるように表記している。取り込まれた CO_2 由来の炭素原子は、まず PGA の 1 位に配置される。

Fig. 3-16 に ^{13}C 添加から 10 min までの PGA の各フラグメントの MDV を示す. これより PGA の 1 位炭素の MDV は ^{13}C 標識 Na_2CO_3 添加後 1 min には定常状態に達したことが分かる. これは, 添加された ^{13}C 標識炭酸が速やかに未標識の炭酸と混合され, さらにカルビンサイクルが高速に回転していたことを表している. PGA の 1 位炭素は定常時に $^{13}\text{C}/(^{12}\text{C}+^{13}\text{C})=0.39$ となることから, この割合が実際の培養槽内での炭酸の ^{13}C 標識パターンであると判断した.

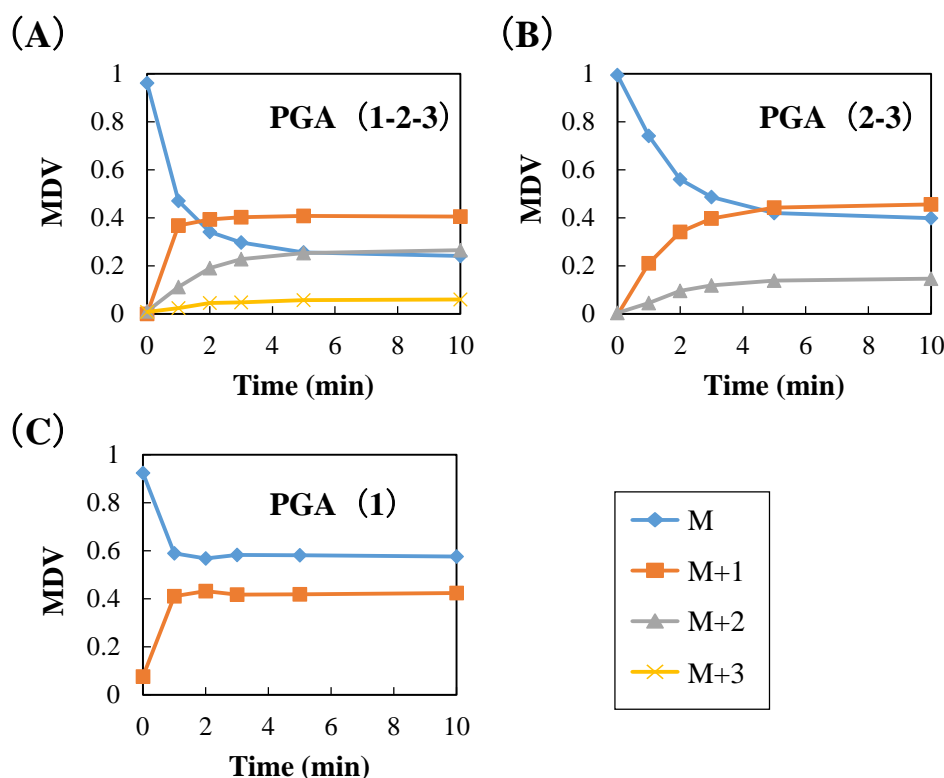


Fig. 3-16 ^{13}C 添加後 10 min までの PGA の各フラグメントの MDV の変化. PGA の 1-2-3 位の骨格炭素の MDV (A), PGA の 2-3 位の骨格炭素の MDV (B) および (A), (B) から算出される PGA 1 位炭素の MDV (C) を示す. (A), (B) は Fig. 3-12 に示したデータと同一である. 横軸は ^{13}C 標識 Na_2CO_3 の添加以降の時刻である. M は未標識フラグメントの質量を示す. 時刻 0 min のデータは ^{13}C 添加前に測定した. PGA の 1 位炭素は ^{13}C 添加後 1 min 以内に同位体的定常状態に達したことが分かる.

3-3-3 代謝物質プール量の測定結果

CE-MS 分析によって定量した代謝物質のプール量を Table 3-4 に示す.

Table 3-4 代謝物質プール量の測定結果.

代謝物質	プール量 ($\mu\text{mol/gDCW}$)	
	平均	標準偏差
G6P	0.17	0.02
F6P	0.06	0.01
FBP	0.86	0.17
DHAP	1.28	0.14
3PG	4.20	0.54
2PG	0.38	0.01
PEP	1.88	0.10
PYR	0.00	0.00
AcCoA	0.05	0.00
6PG	0.04	0.00
S7P	0.04	0.00
R5P	0.02	0.00
Ru5P	0.06	0.00
RuBP	0.53	0.08
CIT	0.14	0.00
ACO	0.38	0.04
IsoCIT	8.37	0.51
2OG	0.05	0.03
SUC	0.45	0.04
FUM	0.00	0.00
MAL	0.10	0.00
GOX	0.00	0.00
Glu	629.46	30.04
Asp	3.52	0.29

標準偏差は 3 回の分析結果から算出した.

3-3-4 代謝フラックス分布とプール量のフィッティング

測定した代謝物質の MDV データに対して、代謝フラックス分布とプール量のフィッティングを行った。まず Fig. 3-3 および Table S-3 に示した代謝経路を計算機上で規定し、各代謝物質の IDV の時間変化を表現する 772 式からなる連立微分方程式を準備した。フィッティングに使用する ^{13}C 標識パターンとしては、GC-MS 分析および LC-MS/MS 分析により得られた MDV データのうち、Table 3-5 に示すものを用いた。LC-MS/MS 分析では数種類の代謝物質について C-C 結合が解離したプロダクトイオンが測定できたが、それらの多くは解離する C の位置情報が不確定であったためフィッティングには使用しなかった。唯一 SUC-44 フラグメントについては、SUC の構造が対称であるため使用した。

Table 3-5 フィッティングに使用した MDV データ.

分析装置	代謝物質	炭素骨格
GC-MS	PGA	1-2-3
	PGA	2-3
LC-MS/MS	G6P	1-2-3-4-5-6
	F6P	1-2-3-4-5-6
	FBP	1-2-3-4-5-6
	DHAP	1-2-3
	PEP	1-2-3
	6PG	1-2-3-4-5-6
	S7P	1-2-3-4-5-6-7
	R5P	1-2-3-4-5
	Ru5P	1-2-3-4-5
	X5P	1-2-3-4-5
	SUC	1-2-3-4
	SUC	1-2-3 (2-3-4)
	MAL	1-2-3-4
	2OG	1-2-3-4-5
Asp	1-2-3-4	

SUC は対称性のある分子構造をしているため、1 位炭素と 4 位炭素が区別できない。SUC-44 フラグメントは 1-2-3 位の炭素の標識情報を持つとともに、これは 2-3-4 位の情報と等価である。

中間代謝物質の多くは ^{13}C 添加から 10 min 程度でその ^{13}C 標識パターンが定常に達し、最も大きな変化を見せたのは 5 min までの範囲であった (Fig. 3-14). ^{13}C 標識パターンの変化の仕方と計算コストを考慮して、本解析では 5 min までの実測 MDV データを用いて代謝フラックス分布とプール量を算出した。代謝物質のプール量は 3-2-1-4 に示したように、代謝物質ごとのプール量の相対的な関係をできるだけ保持しつつフィッティングパラメータとして扱った。ただし CE-MS にて測定できなかった GAP, X5P, OAA のプール量は制約のないフィッティングパラメータとした。

Fig. 3-17 はフィッティング後のパラメータから推定される MDV の推移を示す。フィッティング後のパラメータによって、 ^{13}C 標識パターンの変化の速い代謝物質と遅い物質を概ね説明できている。

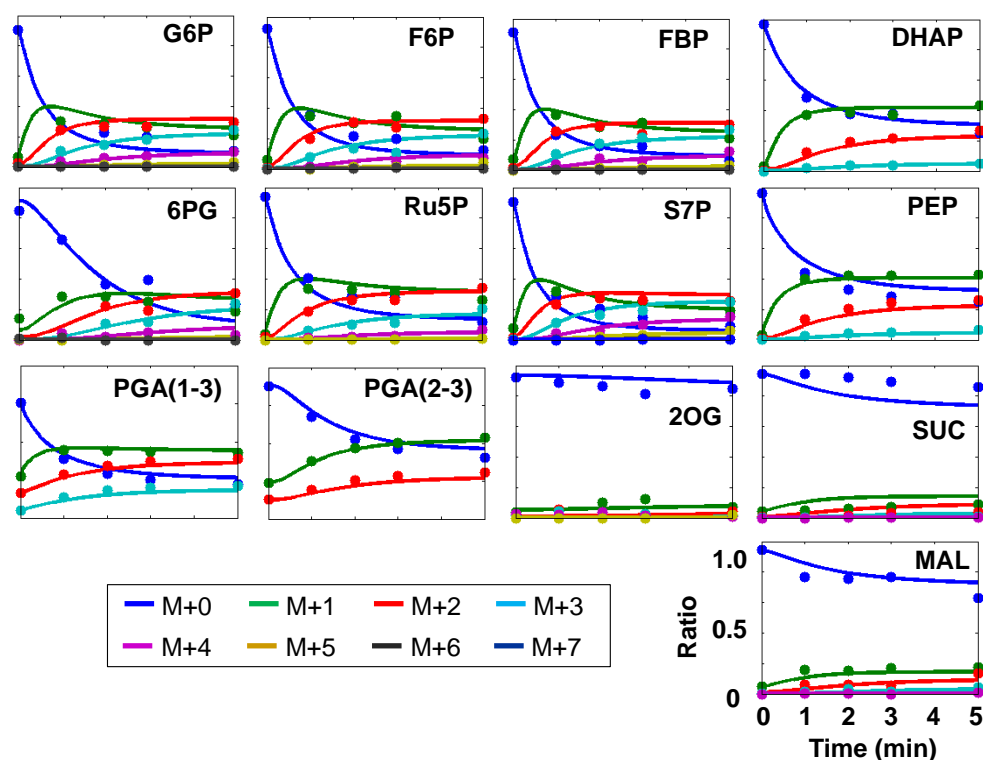


Fig. 3-17 実測 MDV データとフィッティング後の推定値の対応。

点は実測 MDV, 線はフィッティング後の代謝フラックス分布および代謝物質プール量から推定される MDV の経時変化である。M は未標識の代謝物質 (フラグメント) の質量である。代謝物質名の後の括弧は、フラグメントイオンが持つ骨格炭素の番号を示す。全ての実験データは天然同位体補正をしておらず、人為的に加えた ^{13}C 以外に天然に存在する同位体の影響が表れている。そのため ^{13}C を導入する前の時刻 0 min であっても各物質の $\text{MDV}_{\text{M}+0}$ は 1 を下回っている。GC-MS 分析した PGA は TMS 化による修飾を受けており、天然同位体の影響を強く受けている。推定した MDV は、逆に、分子中の骨格炭素以外の原子の天然同位体を考慮して補正されている。

フィッティング後の代謝物質プール量は、全体的に3倍程度大きくなった (Fig. 3-19). これは 3-2-1-4 に記述したように測定したプール量全体に一律に掛けるパラメータの影響である. 代謝物質を細胞から methanol 抽出する以前に菌体が破碎されるなどして, 細胞内の代謝物質の回収量が低下した可能性を反映していると考えられる.

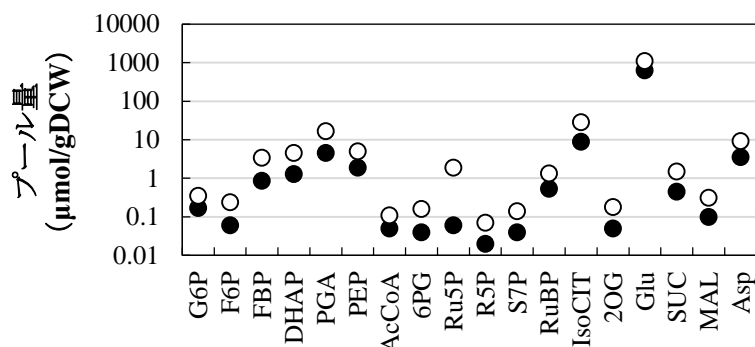


Fig. 3-19 実測代謝物質プール量とフィッティング後の推定値の対応. 実測値 (●) およびフィッティング後の推定値 (○) を示す.

同位体的非定常状態における代謝フラックス解析では, 測定した ^{13}C 標識パターンの変化から代謝フラックス分布と, 代謝物質プール量をフィッティングにより推定した. 代謝物質の ^{13}C 標識パターンの変化が速い場合, 代謝フラックスが大きくなることで対応を取ることができる. また一方, その代謝物質のプール量を小さくすることでも, ^{13}C 標識パターンを説明できる場合があると考えられる. 実際に, 代謝物質プール量に制約を設けずにフィッティングを行うと, 推定された代謝フラックス分布は Fig. 3-18 から大きく変化し, プール量は実測値とほとんど相関をもたなかった (Fig. S-4). よってプール量と代謝フラックスのどちらを変化させても MDV の時間変化を説明でき, 両者の推定を正しく行えないと考えられる. 本研究では, 測定したプール量の代謝物質ごとの相対的な関係をできるだけ保存するように制約を課し (3-2-1-4), その上で求めた結果を Fig. 3-18 に示した.

代謝フラックス解析による推定結果の正しさを評価するには, 推定結果を他の方法で検証することが有効である. 例えば, 複数条件間で大きな代謝フラックス変化が推定された反応について, 代謝物質のプール量を測定し, 粗細胞抽出液を用いた酵素活性測定によって, その反応速度の変化を定性的に確認することが可能である. 特に, 代謝フラックス解析からこれまで知られていなかった代謝変化が推定された場合, このような検証によって解析結果の正しさを保証することになると考えられる.

またそのほかに, クロスバリデーションを行うことによって, 解析の正しさを一定

程度検証することができるだろう。一部のデータだけを用いてフィッティングを行い、使用しなかったデータを説明できるかを確認する。しかし代謝物質の ^{13}C 標識パターンはデータ間の独立性が小さい。代謝経路内で近い代謝物質はその MDV データも当然近くなり、クロスバリデーションの対象として効果が大きくないと考えられる。データの独立性という観点から、 ^{13}C 標識パターンと比較して、代謝物質プール量はクロスバリデーションによる検証がより効果的であると考えられる。分析技術の向上によって、代謝物質プール量の正確な定量や、より多くの代謝物質を測定対象にできれば、検証の組み合わせを増やすことができるだろう。

3-3-5 光独立栄養条件における代謝フラックス分布

光独立栄養条件において細胞が取り込んだ炭素をどのように代謝しているかを考察する。光合成によりカルビンサイクルのフローが大きく、RuBisCO による CO_2 固定速度は 5.18 mmol/gDCW/h であった (Fig. 3-18)。この値は、三角フラスコを用いた混合栄養条件における RuBisCO の CO_2 固定速度 (1.8 mmol/gDCW/h) と比べて3倍程度大きい (Fig. 2-16)。本実験では CO_2 通気で培養系を高炭酸濃度に保っており、 CO_2 固定速度が向上したと考えられる。光独立栄養条件では CO_2 のみを基質とするが、混合栄養条件における CO_2 と glucose の総炭素取り込み速度 ($5.0 \text{ mmol-C/gDCW/h}$) とほぼ同等となった。一方で比増殖速度は混合栄養条件 (0.105 1/h) に比べて光独立栄養条件では若干低い (0.091 1/h)。RuBisCO 反応で取り込んだ炭素を別の代謝反応によって CO_2 として排出するのが原因で、代謝フラックス解析結果によると寄与が大きいのは TCA サイクルである。TCA バイパス経路を含む TCA サイクルのフローが生じており、 CO_2 排出によるロスが大きくなっている。中央代謝系において、その他について見ると $\text{PYR} \rightarrow \text{AcCoA}$ の反応による CO_2 排出が大きい。これは TCA サイクルに炭素を供給する影響である。一方で OPP 経路は混合栄養条件では炭素フローがあるのに対して、光独立栄養条件ではほとんど代謝フラックスは 0 である。考えられるのは、本実験では照射した光強度が大きく、光合成電子伝達系で生産される NADPH が十分存在したという理由である。OPP 経路は CO_2 排出を伴って NADPH を生成するため、細胞増殖に有利に働かず、代謝フラックスが小さくなったと考えられる。

3-3-6 代謝反応のキネティクスについての考察

同位体的定常状態における代謝フラックス解析では¹³C標識のダイナミクスを測定したが、それは代謝反応のキネティクスの情報も含んでいる。以下ではそれを示す。

まず Fig. 3-20 に示す簡易な代謝経路を考える。

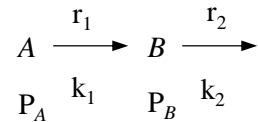


Fig. 3-20 簡単な代謝経路。

代謝経路中に代謝物質 A, B が存在する。代謝フラックスを r, 代謝物質プール量を P で表し、代謝反応の反応速度に関わるパラメータを後述のように k とする。

代謝状態は定常であるとし、代謝フラックスおよび代謝物質プール量は一定であるとす。代謝物質 B についてみると生成フラックスと消費フラックスが釣り合うから、

$$r_1 = r_2 \quad (43)$$

となる。また代謝定常点近傍において、2 つの代謝反応を以下のように一次近似する。

$$r_1 = k_1 \cdot P_A \quad (44)$$

$$r_2 = k_2 \cdot P_B \quad (45)$$

k は酵素濃度や酵素活性などを包含するパラメータである。

一方、代謝物質 B の¹³C 標識パターンの時間変化を IDV で表現すると、

$$\frac{d}{dt} IDV_B = \frac{1}{P_B} (r_1 \cdot IMM_{A \rightarrow B} \cdot IDV_A - r_2 \cdot IDV_B) \quad (46)$$

となり、式(43), (45)より式(46)は以下のように変形できる。

$$\frac{d}{dt} IDV_B = k_2 (IMM_{A \rightarrow B} \cdot IDV_A - IDV_B) \quad (47)$$

式(47)を解くと、IDV_Bの初期値をIDV_Bとして、

$$IDV_B = (IMM_{A \rightarrow B} \cdot IDV_A - IDV_B)(1 - e^{-k_2 t}) + IDV_B \quad (48)$$

となる。よって IDV_B の時間変化の時定数 τ は、

$$\tau = 1/k_2 \quad (49)$$

である。¹³C 標識パターンのダイナミクスは実測できているため、Fig. 3-14 から時定数 τ を直接取得することができる。すなわち代謝反応のキネティクスに関わる k₂ を求めることができる。

実際の細胞内では、¹³C 標識 CO₂ が細胞に取り込まれ、CO₂ 固定反応から順に¹³C 標識されていく。代謝経路の構造上、CO₂ 取り込み反応から遠い代謝物質には、¹³C 標識

の遅れが累積する。ここでは、CO₂から各代謝物質まで至る代謝経路の複雑さを捨象し、Fig. 3-20 のモデルに当てはめて考える。CO₂を図中の代謝物質 A、実測した各代謝物質を代謝物質 B と見立てて、それぞれの k₂を算出した結果を Fig. 3-21 に示す。解糖系およびペントースリン酸経路中の代謝物質は概ね近い k₂を持つことが分かる。すなわち、RuBisCO 反応から解糖系、ペントースリン酸経路（カルビンサイクルを含む）のなかに反応速度を大きく低下させる要因は存在しないとおおよそ言えるだろう。一方で、TCA サイクル中の SUC や 2OG の k₂は小さいことが分かる。PEP の k₂は小さくないため、PEP から SUC や 2OG に至るまでに k₂を低下させる要因が存在することが分かる。式 (43)-(45)より、

$$k_2 = k_1 \cdot P_A/P_B \quad (50)$$

である。プール量を人為的にコントロールすることは困難であるため、k₂を大きくするための操作変数としては k₁の増大が有効と考えられる。すなわち、より 2OG や SUC への代謝フラックスを大きくするには、PEP からこれら代謝物質に至るまでの酵素遺伝子発現量の増加、酵素活性の向上が取ることの可能な手段である。

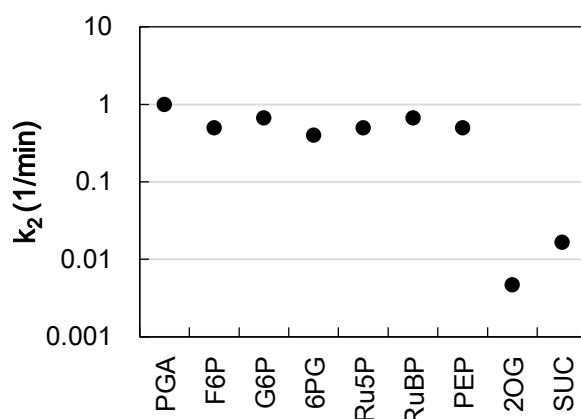


Fig. 3-21 各代謝物質における k₂.

各代謝物質について ¹³C 標識ダイナミクスの時定数を算出し、k₂を求めた。解糖系、ペントースリン酸経路内の代謝物質に比べて、TCA サイクル中の代謝物質の k₂が小さいことが分かる。

以上に示すように、同位体的非定常状態における代謝フラックス解析手法は、定常な代謝フラックス分布を推定するだけでなく、代謝反応のキネティクスに関する情報を直接取得できる。これは第 2 章で行った同位体的非定常状態とは異なる新しい利点であり、代謝経路内の律速段階を絞り込むためにも有効である。今後、分析技術の向上によって、さらに多くの代謝物質を測定可能にし、また代謝物質の ¹³C 標識パターンの測定精度を向上させることで、キネティクスの情報をより豊富に取得できると期待される。

3-3-7 光独立栄養条件の物質生産に向けた考察

シアノバクテリアを用いた物質生産の大きな利点は CO_2 を基質として光合成により有用化合物を生産できる点である。ここでは、光独立栄養生育する細胞の代謝を物質生産に向けてどのように改変すれば良いか議論する。

物質生産に向けた代謝の改変戦略を立てるには、物質生産に対して理想的な代謝状態と実際の代謝状態の差に注目することが有効である。Fig. 3-22 に、本実験で求めた *Synechocystis* 細胞の光独立栄養条件での代謝フラックス分布と、物質生産の例として butanol を最大効率で生産する代謝フラックス分布を示す。比較のために両代謝フラックス分布はカルビンサイクルにおける CO_2 の取り込み速度で規格化しており、これによって細胞の炭素の固定能力ではなく、 CO_2 固定後の炭素の分配を議論することができる。

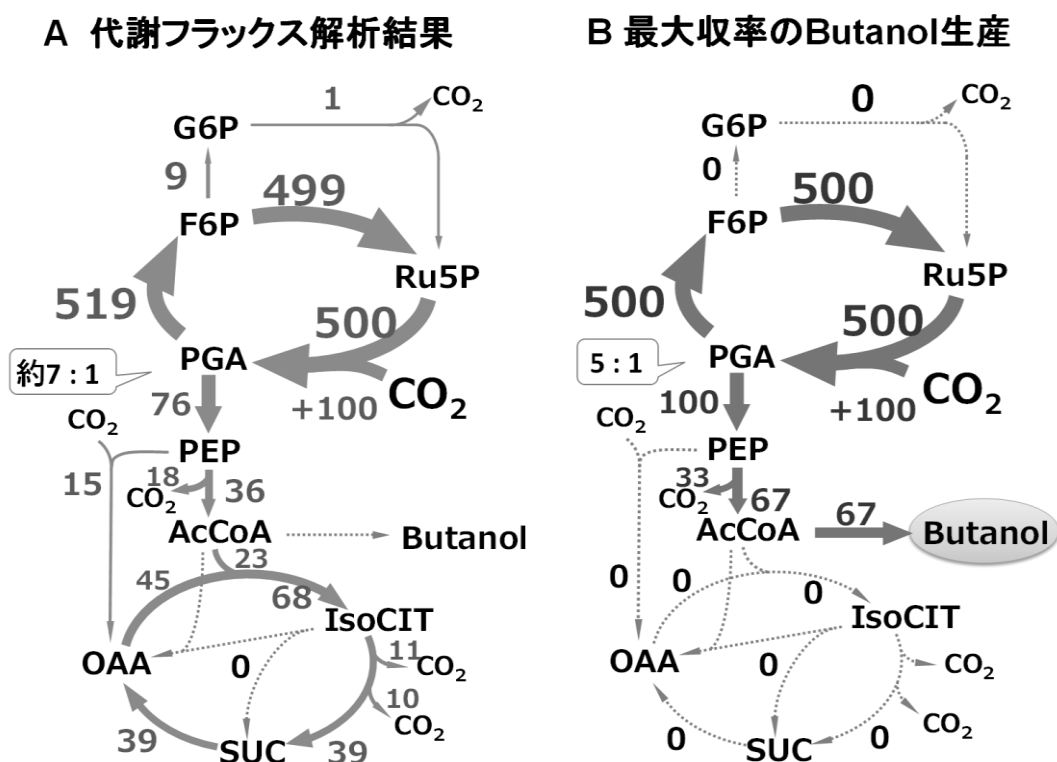


Fig. 3-22 光独立栄養条件における細胞内の代謝フラックス分布 (A) と butanol 生産収率を最大化する代謝フラックス分布 (B) の比較。

数値は代謝経路に流れる炭素原子量 (単位: mol-C/gDCW/h) を表しており、カルビンサイクルにおいて流入する炭素を 100 として規格化した。(A) は Fig. 3-18 に示した本実験で算出した代謝フラックス分布と本質的に同一である。なお *Synechocystis* は butanol 合成経路を持たないため、(B) では AcCoA 2 分子から butanol を合成する代謝経路を付加してある。

代謝を butanol 生産に向けて最適化するための戦略として、大きく 2 つのポイントが見出せる。

1 点目は競合経路の削減である。 *Synechocystis* は光独立栄養条件では CO₂ を固定し、その炭素は主にバイオマス生産のみに使用されることが知られている (Young *et al.*, 2011)。すなわち物質生産へより炭素を分配するにはバイオマス合成を抑える必要がある。特に AcCoA, OAA, G6P を前駆体とするバイオマス合成フラックスを低減することの効果が高い。例えば AcCoA, OAA, G6P からバイオマスへ向かう炭素フローを遮断できた場合、本来バイオマス合成に使用される炭素のうち約 50% をさらに目的物質生産に使用することができる。バイオマス合成に加えて、CO₂ としての炭素の排出が無視できない。OPP 経路, AcCoA 合成, TCA サイクル, リンゴ酸酵素経路は CO₂ の排出を伴い、フラックス解析結果からは、TCA サイクルおよび AcCoA 合成による CO₂ 排出が大きいことが分かった。この 2 経路によってカルビンサイクルによって固定した炭素のうち約 4 割を失っていることが分かる。そこで TCA サイクルには必要以上の炭素を流さないという代謝改変が有効と考えられる。TCA サイクルへの炭素フローを低下させるのに付随して AcCoA 合成に伴う CO₂ 排出も抑えることができる。AcCoA は解糖系と TCA サイクルとを結ぶ重要な中間代謝物質であり、その合成経路の機能を低下させることは難しい。一方 AcCoA は多数の有用化合物の前駆体でもあり、その CO₂ 排出は最大効率での butanol 生産時にも固定した炭素の 1/3 のロスをもたらしている。細胞の代謝経路に依存するこの根本的な問題を解決するには、近年報告された CO₂ 排出を伴わない AcCoA 合成経路が有効だと考えられる (Bogorad *et al.*, 2013)。一般的には 1 分子の F6P から 2 分子の AcCoA が合成されるが、この新規経路では正味の反応として 1 分子の F6P を 3 分子の AcCoA に変換できる。シアノバクテリアにこの経路を導入することができれば、炭素の利用効率を最大で 1.5 倍に向上させられる。すなわち光合成機能を最大 1.5 倍向上させるのと同等の効果があり、非常に有効性が高い戦略だと考えられる。

代謝改変戦略として有効な戦略の 2 点目は、カルビンサイクルから目的物質生産経路への炭素フローの分岐比の最適化である。シアノバクテリアはカルビンサイクルを 1 回転させることで CO₂ を固定し、5 炭素の化合物である RuBP から 3 炭素の PGA を 2 分子合成する。つまり、CO₂ 合成速度を維持するためにはカルビンサイクルに一定量の炭素フローが存在する必要がある。生産経路の炭素フローを大きくしすぎると CO₂ 固定速度そのものを減少させてしまう。炭素のバランスを考えれば、カルビンサイクルから流出する炭素フローの総和は CO₂ 取り込み速度に一致しなければならない。butanol 生産の例で考えると、butanol の前駆体となる AcCoA を合成するにはカルビンサイクル中の PGA における分岐比が重要となり、enolase 反応 (PGA→PEP) により炭素フローを AcCoA 方向に流入させる必要がある。そのときの理想的な分岐比はカルビンサイクルのフロー 5 に対して enolase 反応 1 である (Fig. 3-22 B)。一方代謝フラックス解析結果

より、実際の細胞においてこの分岐比は約7:1であった (Fig. 3-22 A). そこで, butanol 生産収率を最適化するためには *enolase* 反応を強化し分岐比を調整することが有効と考えられる. ただし, カルビンサイクルから過剰に炭素を流出させると CO₂ 固定速度が低下し, 培養系全体としての生産速度の低下を招く. PGA の分岐点において最適な代謝フラックス比を維持するには, 微妙な発現制御技術が必要になると考えられる.

ここで議論した butanol を最大効率で生産するというモデルケースは, 菌体合成を伴わないため培養系全体としての生産速度は低下する可能性がある. しかし菌体量を増やす培養フェーズと菌体合成を抑えた物質生産フェーズの 2 段階に分ける培養方法も有効な生産プロセスとして提案されている (Fig 3-23). 細胞増殖, すなわちバイオマスの合成と物質生産はともに炭素を基質とする性質から並立させにくい. そこで, 代謝状態をスイッチさせる仕組みを設け, それぞれのフェーズにおいて増殖や物質生産に向けて細胞の代謝状態を最適化させ, プロセス全体として高生産性を達成させる. 増殖時と生産時の切り替えには, 細胞内に遺伝子回路を構築する手法が実証されている (Soma *et al.*, 2014) ほか, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) などの薬剤の添加による発現調節 (Lan and Liao, 2012), 窒素や硫黄などの栄養素の制限による菌体増殖の阻害 (Jiang *et al.*, 2011 ; Jiang *et al.*, 2012) といった方法が用いられる.

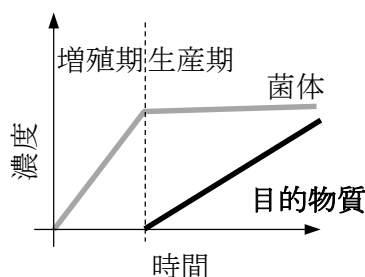


Fig. 3-23 2段階培養のイメージ.

増殖期と物質生産期を分離し, 各フェーズでそれぞれに代謝状態を最適化することで全体として高生産速度を達成する.

ここでは butanol を物質生産のモデルケースとして議論した. butanol は実際にシアノバクテリアを用いて生産が実証されている有用化合物である (Lan *et al.*, 2012). シアノバクテリアを用いたその他の物質生産対象として ethanol, lactate, isobutanol, butanol, ethylene, isoprene, sucrose などが挙げられるが, これらの多くは PYR, AcCoA を前駆体とする (Fig. 3-24). そのため butanol 生産について行った議論はその他の物質生産にも応用可能な知見だと考えられる.

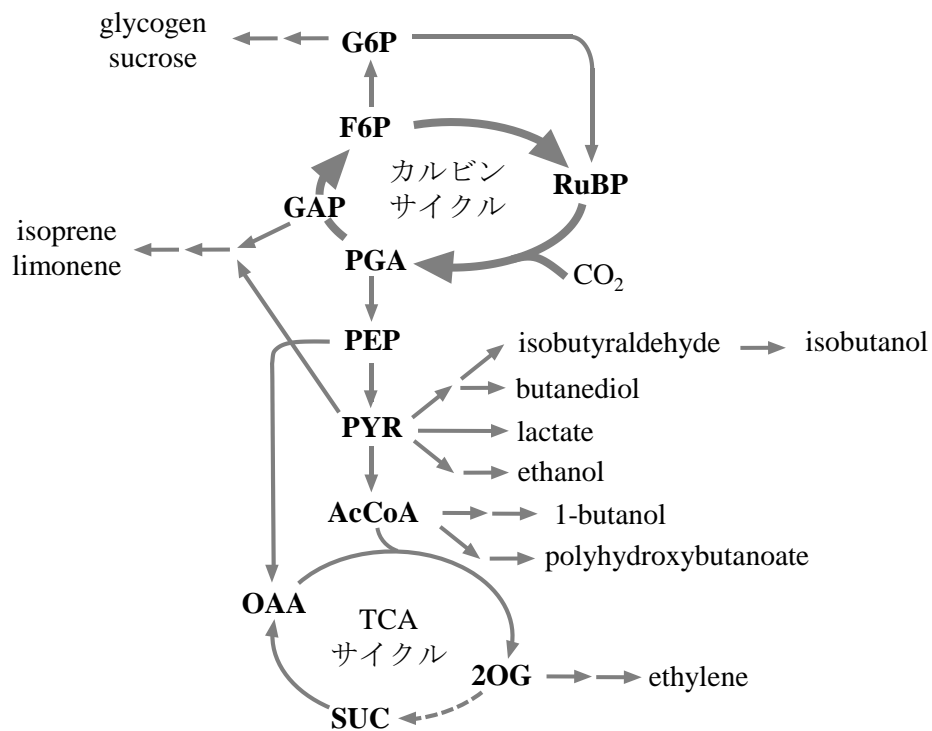


Fig. 3-24 シアノバクテリアで生産が試みられている有用化合物とその合成経路. 糖, アルコール, アルデヒド, オレフィン, 有機酸, テルペノイドなどの生産が実験的に行われ, 多くの化合物は **PYR**, **AcCoA** を前駆体として合成される.

3-4 結言

微生物を用いた物質生産において、その生産収率を向上させるには、細胞が取り込んだ炭素をどのように中央代謝系内で分配するかを把握することが重要である。シアノバクテリアを用いた光合成による物質生産についても同様に、代謝フラックス分布を解析することで物質生産に向けて有効な代謝改変戦略を見出すことができると考えられる。そこで本章では、CO₂を単一炭素源とする光独立栄養条件における代謝フラックス解析手法の開発を行い、*Synechocystis*の中央代謝のフラックス分布を明らかにした。加えて、固定したCO₂をより効率的に目的物質に変換するために有効な代謝改変戦略を考察した。

光独立栄養条件では、¹³C 標識 CO₂を菌体に摂取させ、その後細胞内の代謝物質が¹³C 標識されていく過程から代謝フラックス分布を推定することができる。そこで代謝フラックス解析に適した¹³C 標識実験系として、培養中に¹³C 標識炭酸水を添加する手法を構築した。¹³C 標識炭酸水の添加により瞬間的に培養系に¹³Cを導入でき、CO₂由来の炭素が最初に配置されるPGAの1位炭素の標識パターンは1 min以内に定常になることが確認された。また、各代謝物質に¹³Cが導入されていく過程を捉えるために、連続サンプリング系を構築した。特別な処理装置を導入し複数人数で作業を分担することでサンプリング間隔を短くでき、1 min間隔で安定して代謝物質の¹³C標識パターンを測定することができた。中央代謝系内の代謝物質の¹³C標識パターンの変化から、代謝フラックス分布とプール量を推定した。

新しく構築した代謝フラックス解析系によって、*Synechocystis*の光独立栄養条件の代謝フラックス分布を明らかにすることができた。その結果、光独立栄養条件ではペントースリン酸経路がカルビンサイクルとして還元方向に強く機能していること、OPP経路の代謝フラックスは小さいことが確認された。また固定した炭素のうち4割程度はCO₂として排出され、残りの炭素がバイオマス合成に使用されていることが分かった。

続いて、解析した光独立栄養条件の代謝フラックス分布を、*butanol*を最大収率で生産する場合の代謝フラックス分布と比較し、物質生産に向けてどのように代謝を改変することが有効であるかを考察した。その結果、菌体合成とCO₂排出に関わる反応の代謝フラックスを小さくする戦略と、カルビンサイクルから物質生産方向に炭素を分岐するフローの大きさが重要であることが示唆された。これらは生産させる目的物質に依らず一般的な改変方針として有効であると考えられる。

また、本研究で構築した代謝フラックス解析法では、代謝物質の¹³C標識パターンの変化を測定するが、これは代謝反応のキネティクスに関わる情報を直接捉えることになる。その結果、定常の代謝フラックス分布を推定しただけでなく、代謝経路中の律速段階を部分的に絞り込むことができるようになった。今後、さらに多くの代謝物質を観測

可能にし、また代謝物質の ^{13}C 標識パターンの推定精度を向上させることで、キネティクスに関する情報をより多く取得できるようになるだろう。

シアノバクテリアの代謝フラックス解析手法を開発したことで、実際の代謝状態と物質生産に理想的な代謝状態の差の比較が可能になった。物質生産に向けた代謝の改変戦略を明確にすることができ、効率的に生産収率の向上を狙うことができると期待される。これにより、ブラックボックスに近い代謝システムを量的に把握しながら改変し、より高い生産収率を達成することができるだろう。

4章 窒素制限条件での代謝解析

4-1 緒言

微生物を用いた物質生産において、生産収率の向上には、取り込んだ炭素の代謝系内での分配を改変することが重要である。より目的物質へ向けて炭素を振り分け、競合経路の炭素フローを小さくすることで炭素のロスが減らさなければならない。シアノバクテリアを用いた物質生産において、主に目的物質生産と競合するのはバイオマス合成である。バイオマスの合成、つまり菌体増殖との競合を避けるためには、目的物質に含まれず菌体成分の合成に必要な栄養素を制限する戦略が有効とされる。具体的には窒素源、硫黄源、リン源の制限などが一般的である (Sharma *et al.*, 2012)。特に窒素は、シアノバクテリアが自然界で生育する際に不足しやすい栄養素でもあり、細胞の環境応答を調査する意味でも研究が盛んに行われてきた。

窒素源を含む培地から窒素源を含まない培地にシアノバクテリアを移すと、*glycogen* が細胞内に蓄積されることが知られている (Allen, 1984 ; Hickman *et al.*, 2013)。窒素制限下で *glycogen* の蓄積が生じるということは、カルビンサイクル中の代謝物質である F6P から *glycogen* に至る炭素フローが上昇することを示している。よって第3章で重要と述べた、カルビンサイクルから流出する炭素フローの流量と、その分岐点が窒素制限下では変化することを示唆している。メタボローム分析によっても、窒素制限下において代謝物質プール量に変化が見られているほか (Osanai *et al.*, 2014)、中央代謝系に関わる遺伝子の発現を制御するシグマ因子やレギュレータ (*sigE*, *rre37*) の発現量が上昇することも知られている (Azuma *et al.*, 2011 ; Osanai *et al.*, 2006)。そこで窒素制限下では単に菌体増殖が停止するわけではなく、代謝の再構成を伴うことが示唆される。しかし、これまで代謝フラックスの変化は明らかにされておらず、遺伝子発現量や代謝物質プール量の変化から推測されているにすぎなかった (Azuma *et al.*, 2011 ; Krasikov *et al.*, 2012 ; Osanai *et al.*, 2014)。本論文の第2章の結果からも、遺伝子発現量や代謝物質プール量の変化が、必ずしも代謝フラックスの変化を説明できないことが示されている。

本章では、窒素制限条件で代謝フラックス解析を行い、窒素制限下でどのように細胞内で炭素が分配されているかを明らかにすることを目的とした。代謝フラックス解析により窒素制限条件における炭素フローを明らかにすることで、目的物質の生産に対して炭素フローをどのように改変すれば良いかを明らかにできるだろう。また炭素フローが大きな経路を同定できるため、窒素制限下で細胞に生産させやすい有用物質の同定も可能となると考えられる。窒素制限条件は一般的に CO₂ のみを炭素源とする光独立栄養条件で構築して研究に用いられるため、第3章で開発した ¹³C 標識 CO₂ を用いた同位体の非定常状態における代謝フラックス解析を行った。

^{13}C 標識実験を用いて代謝フラックスを推定するには、標識実験を通して代謝状態を定常に保つ必要がある。しかし窒素を含まない培地を用いる窒素枯渇条件でシアノバクテリアを培養した場合、細胞の状態は時間的に変化し、数日後にはほとんどの生理活動を停止させる休止状態へ移行する (Görl *et al.*, 1998 ; Krasikov *et al.*, 2012)。 ^{13}C 標識実験が難しい理由としてさらに、窒素欠乏をセンスした細胞はタンパク質を分解することで一時的に窒素源を補給するため (Allen, 1984 ; Krasikov *et al.*, 2012)、タンパク質由来の炭素が中央代謝系内に流入する (Hasunuma *et al.*, 2013)。タンパク質由来の炭素が中央代謝系に流入する速度の測定は困難であり、このような条件では、代謝フラックス分布を代謝物質の ^{13}C 標識パターンに反映させることができない。完全に窒素を枯渇させる窒素枯渇条件は ^{13}C 代謝フラックス解析に適さず、適切な培養条件を構築する必要がある。

本章では、代謝フラックス解析を適用できる窒素制限系として *Synechocystis* の硝酸トランスポータ破壊株を使用した (Fig. 4-1)。*Synechocystis* などのシアノバクテリアは、窒素源である細胞外の硝酸イオンおよび亜硝酸イオンを硝酸トランスポータ (Nrt) によって能動的に取り込む (Ohashi *et al.*, 2011)。一方で Nrt が破壊された細胞が硝酸濃度に依存した低速度の増殖を維持することが *Synechococcus elongatus* PCC 7942 で確認されており、硝酸イオンは拡散によっても細胞に取り込まれることが示唆されている (Omata *et al.*, 1989)。そこで *Synechocystis* においても硝酸トランスポータ遺伝子 (*nrt*) を破壊することによって、拡散により微量ずつ窒素が供給される安定な窒素制限状態の構築を試みた。

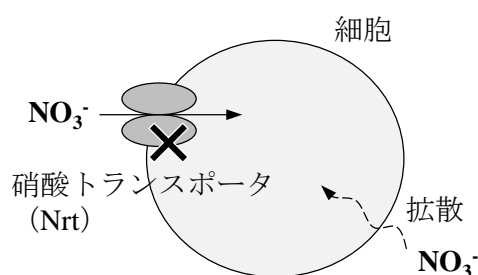


Fig. 4-1 *Synechocystis* の硝酸取り込みのしくみ。

硝酸トランスポータを破壊することで、細胞は細胞外の硝酸イオンを能動的に取り込むことができない。一方、拡散によって硝酸イオンは微量ずつ取り込まれると推測される。

4-2 実験材料と実験方法

4-2-1 $\Delta nrtABCD$ 株の作成

4-2-1-1 $nrtABCD$ 破壊用コンストラクトの作成

本研究では *Synechocystis* の持つ硝酸トランスポータオペロン $nrtABCD$ を破壊対象とした。破壊には、 $nrtABCD$ オペロンの上流下流それぞれ 500 bp の配列間に kanamycin 耐性遺伝子 (Km^R) を挿入したコンストラクトを用いて *Synechocystis* を形質転換した (Fig. 4-2)。

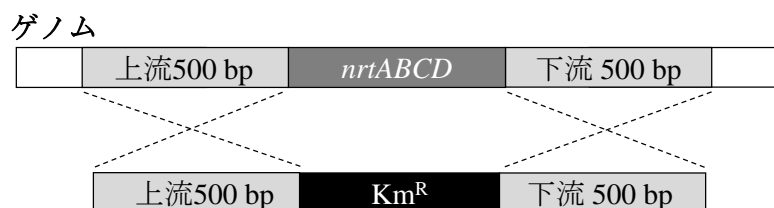


Fig. 4-2 $nrtABCD$ の破壊方法.

まず $nrtABCD$ オペロンの上流および下流配列をそれぞれ取得するため、*Synechocystis* ゲノム DNA を鋳型として、Table 4-1 に示すプライマー P1 と P2、および P3 と P4 の組み合わせを用いて KOD-Plus-NEO (東洋紡) により PCR 増幅した。続いて、得られた $nrtABCD$ オペロンの上下流配列および、pHSG298 由来の Km^R を鋳型として、プライマー P1 と P4 を用いて PCR 増幅した。PCR 産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製した後、*Synechocystis* の形質転換に用いた。

Table 4-1 遺伝子破壊に使用したプライマー.

No.	プライマー名	配列 (5'→3')
P1	nrt_upF	ACAGTGAAAGGTTTGGGAAGG
P2	nrt_upR	TCCCGTTGAATATGGCTCAT- AGTGTAGGCAATAACTAAGGCC
P3	nrt_downF	GATGCTCGATGAGTTTTTCTAA- ACTATCTGGATTAGCTAAATTTTTGC
P4	nrt_downR	CTTTTGGGGACTAGCAACAG

4-2-1-2 *Synechocystis* の形質転換

作成したコンストラクトと *Synechocystis* 細胞をマイクロチューブ内で混合し、34°C、光照射下で数時間インキュベートした。BG11 平板培地にニトロセルロースメンブレン (GSTF04700, Millipore) を載せ、その上に細胞と DNA の混合液を塗布し、34°C、光

照射下でのインキュベーションを継続した。1 day 後、20 µg/mL kanamycin 添加 BG11 にメンブレンを移した。出現したコロニーは、適宜新しい kanamycin 添加プレートに植え継いだ。

4-2-1-3 *Synechocystis* のゲノム DNA 抽出

Synechocystis を液体培養し、培養液を遠心処理し菌体を回収した。100 µL の純水に菌体を懸濁し、NaI 粉末を懸濁液 1 mL あたり 2 g 添加し飽和させた後、37°C で 30 min 処理した。純水を 1.3 mL を加え希釈して遠心し、沈殿を再度純水で洗浄して遠心分離した。沈殿に lysozyme 溶液 600 µL, 10 mg/mL RNaseA (Sigma) を 6 µL 添加し混合した後、37°C で 30 min 処理した。使用した lysozyme 溶液の組成は 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 5 g/L lysozyme である。続いて 10% sodium dodecyl sulfate 溶液を 30 µL, 20 mg/mL proteinase K (New England Biolabs) を 6.3 µL を添加し、振盪しながら 55°C で一晩処理した。得られた菌体抽出液を phenol chloroform 抽出および ethanol 沈殿により精製し、ゲノム DNA を取得した。

4-2-1-4 PCR による *nrtABCD* 破壊の確認

nrtABCD 遺伝子が破壊されたことを確認するために、形質転換体候補株および野生株から取得したゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。使用したプライマーは Table 4-1 の P1 と P4 の組み合わせであり、使用したポリメラーゼは KOD FX Neo (東洋紡) である。

4-2-2 測定項目と測定方法

4-2-2-1 glycogen 蓄積量

まず菌体から glycogen の抽出を行った。培養液を遠沈管に回収し、遠心処理 (10,000 rpm, 10 min, 4°C) の後上清を捨てた。1 mL の純水に菌体を懸濁しマイクロチューブに移した後、遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) 後上清を捨てるという操作を 2 回繰り返した。30% KOH (w/v) を 200 µL 添加し、95°C で 90 min 処理した後、氷上で冷却した。氷冷した ethanol を 600 µL 添加し、1 h 氷上で放置した後、15,000 rpm, 5 min, 4°C で遠心分離し上澄みを除去した。続いて、氷冷した ethanol を 600 µL 添加し 15,000 rpm, 5 min, 4°C で遠心分離し上澄みを除去するという操作を 2 回繰り返した。沈殿物を乾燥させ、純水に溶解させた。

glycogen 濃度の定量には Glycogen Assay Kit, EnzyChrom (E2GN-100, BioAssay Systems) を用い、取扱いはマニュアルに従った。

4-2-2-2 乾燥菌体重量

メンブレンフィルター (H050A047A, ADVANTEC) の重量を予め精密天秤で計測しておいた。OD₇₃₀ を測定した培養液を目的量取り、メンブレンフィルターを用いて吸引ろ過した。フィルターを十分乾燥させ、重量を再測定しその差分から乾燥菌体重量 (単位: gDCW/OD₇₃₀/L) を算出した。

4-2-2-3 吸収スペクトル

400-800 nm における培養液の吸光度を、DU800 (ベックマンコールター) を用いて測定した。測定したスペクトルは測定サンプルの OD₇₃₀ 値で規格化し、さらに 800 nm の値が 0 となるように揃えて比較に用いた。

4-2-3 フラスコ培養

Synechocystis 野生株および構築した Δnrt を、窒素源として NaNO₃ の代わりに 5 mM NH₄Cl を含む BG11 培地を用いて前培養を行った。前培養には 500 mL 三角フラスコを用い、培養液量は 100 mL とした。2 day の前培養の後、窒素源を含まない BG11 培地でリンスして、菌体を 100 mL フラスコを用いた本培養系に植菌した。本培養では NaNO₃ 濃度を 10, 25, 40 mM とした BG11 培地を用いた。なお Δnrt の培地には全て 20 μ g/mL kanamycin を添加した。その他の本培養条件を以下に示す; 培養装置; BR-43FL; 光源, 白色 LED 光 (LC-LED 450W); 光強度, 40 μ mol/m²/sec; 培養液量, 20 mL; 攪拌速度, 150 rpm; 温度, 34°C.

4-2-4 フォトバイオリアクターによる培養

Synechocystis 野生株および Δnrt を、NaNO₃ を 5 mM NH₄Cl で置き換えた BG11 培地を用いて前培養を行った。前培養には 500 mL 三角フラスコを用い、培養液量は 100 mL とした。2-3 day の培養後、窒素源を含まない BG11 培地でリンスした後、両株をそれぞれ 1L 培養槽 (BMZ-01NP3S, エイブル) に OD₇₃₀ が約 0.1 となるように植菌した。培地には 25 mM NaNO₃ に調整した BG11 培地を用い、 Δnrt の培地には前培養も含めて 20 μ g/mL kanamycin を添加した。光の供給は円筒型の培養槽の周囲を囲むようにして設えられた LED パネルを用いて行った。LED パネルは 660 nm と 475 nm の単色光を発する素子からなり、その比率はおおよそ 5:1 である。光量はリアクター表面で 120 μ mol/m²/sec となるように設定した。培養液量は 550 mL, 攪拌速度 200 rpm, 温度 34°C とし、pH は 7.5 とした。また炭素源として、空気に CO₂ を 2.5% の割合で混合したガスを 1 vvm で通気した。

4-2-5 代謝フラックス解析

解析原理や基本的な実験手法は第3章に述べた。ここでは第3章の実験手法から発展させた点、変更した点について記述する。

4-2-5-1 ^{13}C 標識実験

^{13}C 標識実験は、4-2-4 に記載した方法で菌体を回分培養し、指数増殖期に ^{13}C 標識 NaHCO_3 を培地に添加することで行った。 NaHCO_3 は第3章で用いた Na_2CO_3 に比べて添加による培養液の pH 変動を小さくすることができる。 ^{13}C を投入すると同時にリアクターの通気の出入口をともに閉めることで、系内の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比を変化させないようにした。細胞内代謝物質の ^{13}C 標識パターンを測定するために、 ^{13}C 添加後 30, 60, 90, 120, 180, 300, 600 sec 後、および ^{13}C 添加前に 0 sec に相当するタイムポイントのサンプリングを行った。1回のサンプリング工程にはシリンジによる培養液回収、吸引ろ過、予め -40°C に冷却した methanol にフィルターを浸すことによるクエンチングが含まれる。1つのサンプルを GC-MS による中間代謝物質分析、GC-MS による遊離アミノ酸分析、LC-MS/MS による中間代謝物質分析に供したため、1タイムポイントについて1サンプルのみの取得を行った。第3章と比べて処理が簡易になったため、1回のサンプリングに要する時間は 30 sec となり、サンプリング工程は全てを2人で行った。また、CE-MS により細胞内代謝物質プール量を測定するために CE-MS 分析サンプルも取得した。

4-2-5-2 ^{13}C 標識パターン (MDV) の分析

GC-MS 分析による遊離アミノ酸の分析

3-2-5-1 に記載した方法でサンプルを調製し、2-2-5-3 に記載した方法で誘導体化した後分析を行った。

LC-MS/MS 分析による中間代謝物質の分析

3-2-5-1 に記載した方法でサンプルを調製し、純水に溶解し LC-MS/MS 分析に供した。

分析は Agilent 1100 (Agilent Technologies) と API 3200 (AB SCIEX) を用いて行った。カラムは ProteCol-PC18 HQ103 (150 mm×2.1 mm, pore size 3 μm , SGE Analytical Science) を用いた。LC のその他の条件は 3-2-6-2 に同じである。MS/MS 分析には、ネガティブイオンモード、多重反応モニタリングモードを使用した。データの解析にはソフトウェア MultiQuant (AB SCIEX) を用いた。

4-2-5-4 バイオマス合成フラックスの算出

本研究では中央代謝系内の代謝物質がバイオマス合成に流出する代謝フラックスを算出するために、Table 4-2 に示すバイオマス構成式を用いた (Young *et al.*, 2011).

Table 4-2 バイオマス合成に必要な前駆体物質質量.

代謝物質	係数 (mol/kg-biomass)
G6P	1.191
PGA	1.338
PEP	1.002
PYR	1.197
AcCoA	3.624
R5P	0.715
E4P	0.501
2OG	1.233
OAA	2.039
FUM*	-0.683

*FUM は尿素サイクルで生成され、OAA の炭素に由来する.

4-2-5-5 EMU による ^{13}C 標識過程の表現

本章の解析では 2-2-5-2 に記述した EMU を導入した. 代謝物質の EMU の MDV の時間変化を表現するには、2-2-5-2 のように各サイズの EMU 経路について式(51)を立てる.

$$P_n \frac{dX_n}{dt} = \alpha_n X_n + \beta_n Y_n \quad (51)$$

ここで、EMU サイズの小さい順に時間発展を解いていくことで、目的とする代謝物質の MDV の経時変化を算出することができる (Fig. 2-7).

4-2-5-6 ^{13}C 標識パターンの経時変化シミュレーション

本章の解析では、MatLab で利用可能な常微分方程式ソルバーode15s を用いた.

4-2-5-7 フィッティングのアルゴリズム

本研究では実測した代謝物質の MDV の変化に対して、代謝フラックス分布および代謝物質の細胞内プール量、CO₂ の MDV をパラメータとして最適化を行った。粒子群最適化 (PSO ; particle swarm optimization) によって大域的な良解を探索し、続いてレーベンバーグマルカート法によって近傍の局所解を探索した。

PSO は、パラメータセットを個体として扱い、複数の個体からなる集団によって解を探索するアルゴリズムである (Poli *et al.*, 2007 ; Takahama and sakai, 2004)。PSO により 3-2-1-8 に示す残差二乗和 SSR を最適化する。各個体 i は時刻 t における各自の位置 \mathbf{x}_i^t 、移動速度 \mathbf{v}_i^t 、およびこれまでの反復で経験した SSR の最小値 $pbest_i$ とそのときの位置 \mathbf{x}_i^* を記憶している。

$$pbest_i = \min_{\tau=0,1,\dots,t} SSR(\mathbf{x}_i^\tau) \quad (52)$$

$$\mathbf{x}_i^* = \arg \min_{\tau=0,1,\dots,t} SSR(\mathbf{x}_i^\tau) \quad (53)$$

さらに、集団が経験した SSR の最小値 $gbest$ とそのときの位置 \mathbf{x}_g^* の情報を、各個体が共有する。

$$gbest = \min_i pbest_i \quad (54)$$

$$\mathbf{x}_g^* = \arg \min_i SSR(\mathbf{x}_i^*) \quad (55)$$

このとき、時刻 $t+1$ における個体の移動速度は、以下のように求める。

$$\mathbf{v}_{ij}^{t+1} = w \cdot \mathbf{v}_{ij}^t + c_1 \cdot rand \cdot (\mathbf{x}_{ij}^* - \mathbf{x}_{ij}^t) + c_2 \cdot rand \cdot (\mathbf{x}_{gj}^* - \mathbf{x}_{ij}^t) \quad (56)$$

ただし w は慣性重み、 $rand$ は区間[0,1]の一様乱数であり、成分ごとに生成する。 c_1 、 c_2 は自己の最良位置およびグループの最良位置への探索に対する重み付けをそれぞれ表現している。本研究では、 $w=2$ 、 $c_1=c_2=2$ とした。

式(56)から、時刻 $t+1$ における各個体の位置を以下のように更新する。

$$\mathbf{x}_i^{t+1} = \mathbf{x}_i^t + \mathbf{v}_i^{t+1} \quad (57)$$

Fig. 4-4 にフィッティング手順の概要を示す。PSO によるフィッティングには、第 3 章と同様に並列計算を用いた。

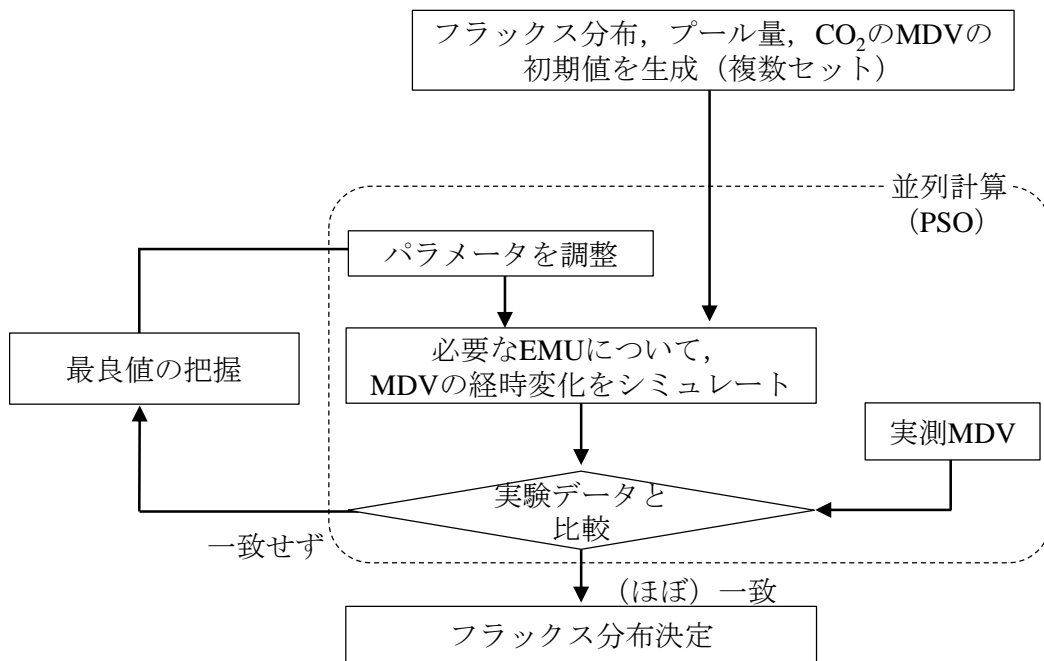


Fig. 4-4 PSO によるフィッティングアルゴリズムの概要.

4-3 結果と考察

4-3-1 Δnrt の構築

安定した窒素制限条件を構築するために、*Synechocystis* $\Delta nrtABCD$ 株の作成を行った。形質転換によりゲノム中の *nrtABCD* オペロンを kanamycin 耐性遺伝子を含む破壊カセットに置き換え、その後細胞内の全コピーのゲノムが破壊カセットで置換されるまで kanamycin を添加した平板培地で植え継ぎを行った。*nrtABCD* 遺伝子の破壊の確認は PCR により行った (Fig. 4-5)。以降 $\Delta nrtABCD$ 株を単に Δnrt と呼称する。

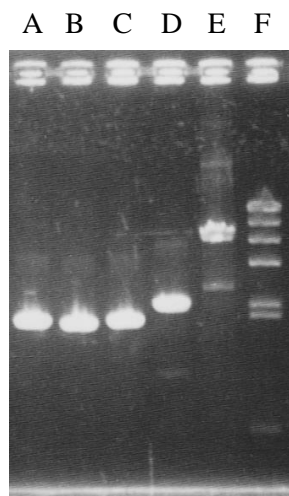


Fig. 4-5 取得した Δnrt の遺伝子破壊の確認。

レーン A-C は破壊候補株，E は野生株，F は λ -*Hind* III マーカーである。プライマーは 4-2-1-1 に示した P1 および P4 を用いており，増幅配列に *nrtABCD* 遺伝子が含まれていれば 6.4 kb のバンドが検出される。*nrtABCD* 遺伝子が Km^R 遺伝子に置換されている場合は 1.8 kb の DNA が増幅される。 λ -*Hind* III に含まれる DNA は大きいものから順に，23130，9416，6557，4361，2322，2027，564，125 bp である。A-C と E の比較により，破壊候補株では *nrtABCD* が破壊され Km^R に置き換えられたことが確認できる。

4-3-2 Δnrt の増殖の硝酸濃度依存性

構築した Δnrt は硝酸トランスポータを持たず，拡散によって取り込まれた硝酸イオンを生育に利用できると推測される。つまり培地中の硝酸濃度が高くなれば取り込み速度も上がり，増殖速度が高くなると考えられる。そこで野生株と Δnrt を異なる硝酸濃度でフラスコ培養し，生育への影響を確認した。培養結果を Fig. 4-6 に示す。野生株は硝酸濃度の違いによっても増殖速度に差がないのに対して， Δnrt は硝酸濃度が高いほど増殖

速度が高くなった. 設計通りに Δnrt では硝酸イオンの取り込みが阻害されたと考えられる. 硝酸濃度と比増殖速度の関係を Fig. 4-7 に示す. Δnrt が培地の硝酸濃度に依存して増殖速度を変化させる傾向は *Synechococcus* sp. PCC 7942 の *nrtA* 破壊株の結果と一致した (Omata *et al.*, 1989). また, 野生株の細胞は青緑色だったが, Δnrt は培養開始とともに黄緑色に変化した. これは色素タンパク質の分解によるものと考えられ, 窒素制限条件で一般的に見られる退色現象を Δnrt で確認できた. しかし一度黄緑色に退色した細胞は培養後期になるにつれて青緑色に回復し, 菌体終濃度の高い 40 mM においては野生株と目視で相違ないほどの青緑色を呈した. 窒素制限応答は細胞内の C/N 比のバランスを感知して生じることが知られている (Forchhammer, 2004). 培養後期に菌体濃度が高まり, 硝酸濃度だけでなく炭酸濃度も不足することで, 窒素制限応答が相対的に和らいだと考えられる.

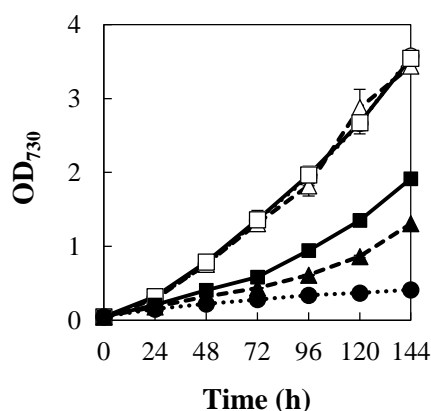


Fig. 4-6 硝酸濃度が増殖に与える影響.

野生株はオープンシンボル (○, △, □), Δnrt はクローズドシンボル (●, ▲, ■) で示す. シンボルの形はそれぞれ硝酸濃度 10 mM (○), 25 mM (△), 40 mM (□) を表す. エラーバーは3回の培養の標準偏差を示すが, 多くの場合シンボルに重なっている.

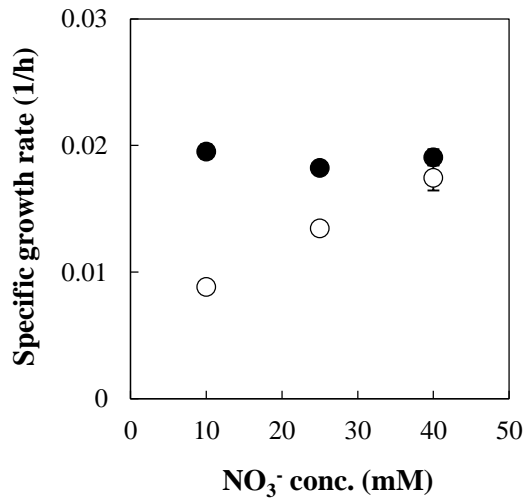


Fig. 4-7 培地の硝酸濃度と比増殖速度の関係.

野生株 (●), Δnrt (○) をそれぞれ異なる硝酸濃度で培養し, 時刻 48-96 h で算出した比増殖速度をプロットした. 各条件 3 回ずつ培養を行い, その標準偏差をエラーバーで示した (多くの場合シンボルよりも小さい). 野生株は培地の硝酸濃度によって増殖速度が変化しないのに対して, Δnrt の増殖速度は硝酸濃度に依存することが分かる.

4-3-3 フォトバイオリアクターを用いた培養による表現型の解析

野生株と Δnrt の培養特性をより詳細に評価するためにフォトバイオリアクターを用いて培養を行った. CO₂ 通気が可能で, LED パネルの出力を高められるため, CO₂ や光の供給が細胞増殖にとって制限とならず, 定常な代謝状態を長期間維持できると考えた. 培地の硝酸濃度を検討するために予備実験を行い, Δnrt の増殖速度が野生株よりも大きく低下し, 窒素制限応答と思われる glycogen 蓄積, 退色が明確に確認された 25 mM の硝酸イオン濃度に設定した. Fig. 4-8 に培養における菌体濃度および glycogen 濃度の経時変化を示す. 野生株に比べて Δnrt は増殖速度が低下し, さらに両株とも OD₇₃₀ が約 1 の濃度まで指数増殖を示した. Table 4-3 にそれぞれの比増殖速度を示すように, Δnrt の比増殖速度は野生株の 1/6 に低下した. また野生株では培養開始より glycogen 濃度が上昇し, その後枯渇するまで濃度は減少し, その後再び増加に転じた. 一方で Δnrt の glycogen 濃度は単調増加した. 菌体が指数増殖している時間範囲 (野生株, 15-21 h; Δnrt , 24-96 h) に注目すると, Table 4-3 に示す比速度で野生株は glycogen を資化, Δnrt は生産した.

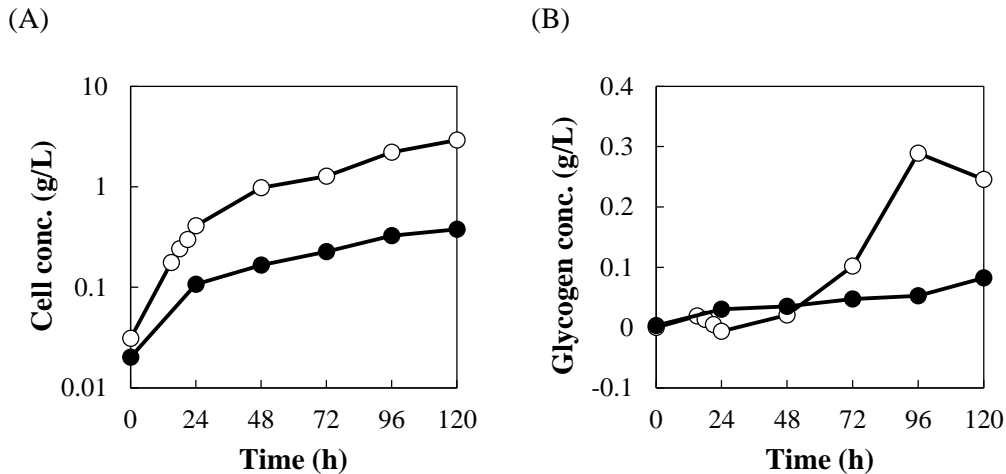


Fig. 4-8 菌体濃度 (A) 及び glycogen 濃度 (B) の経時変化.

シンボルは野生株 (○), Δnrt (●) である. ここで示す菌体とは glycogen を含まないバイオマスである. 算出には各点において OD_{730} , 乾燥菌体重量 (gDCW/ OD_{730} /L, Table S-5) を乗じた値から, glycogen 濃度 (g/L) を引くことで算出した. glycogen 濃度は培養液の体積あたりの glycogen 存在量を示す. 実際は glycogen は細胞内に蓄積されている. glycogen 濃度は測定手法の誤差のため, 負の値が存在している.

Table 4-3 培養結果から算出された比速度.

株	比増殖速度 (1/h)	glycogen 比生産速度 (mg-glycogen/gDCW/L)
野生株	0.089	-10.09
Δnrt	0.015	1.64

野生株は 15-21 h, Δnrt は 24-96 h の範囲において比速度を算出した. 負の比生産速度は glycogen の資化を示している.

4-3-2 と同様に, この培養においても Δnrt の退色が観察された (Fig. 4-9). しかしフラスコ培養と異なり, 退色した Δnrt 細胞は再び青緑色には回復しなかった. この培養では 2.5% の CO_2 ガスを供給しており, 培養後期においても C/N 比のバランスが偏った状態を維持できたためと考えられる. 両株の吸収スペクトルの変化を測定した結果を Fig. 4-10 に示す. phycocyanin の吸収極大は 630 nm, chlorophyll *a* の吸収極大は 680 nm であり, Δnrt ではともに野生株に比べて吸収量が減少しており, 細胞あたりの存在量の低下が確認された. 特に窒素制限時に分解されるアンテナタンパク質である phycobilisome を構成する phycocyanin のピークは, Δnrt においてほぼ完全に消失した. 同様の結果が *Synechocystis* の窒素枯渇培地での培養において示されており (Krasikov *et al.*, 2012), Δnrt では窒素枯渇条件で見られる色素タンパク質の分解が起きたと考えられる.

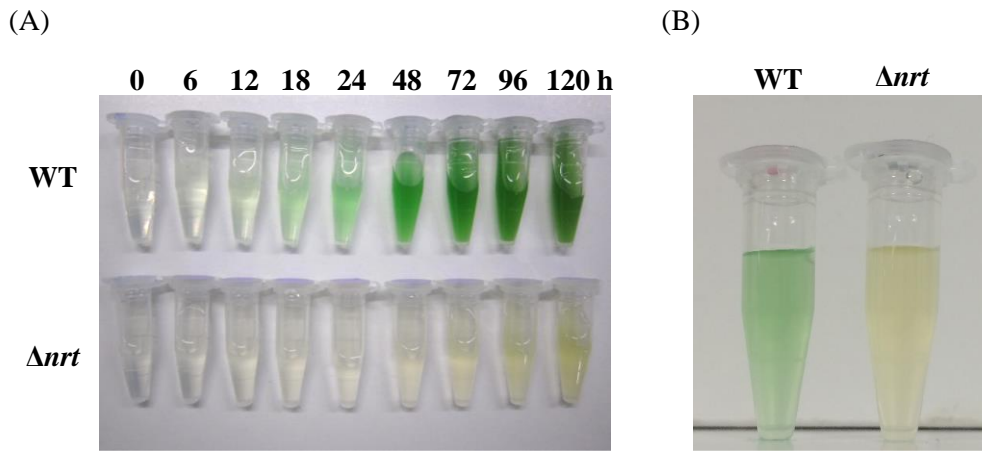


Fig. 4-9 野生株と Δnrt の色の比較.

両株の培養液の各タイムポイントにおけるサンプル (A). $OD_{730} \approx 1$ の培養液の比較 (B).

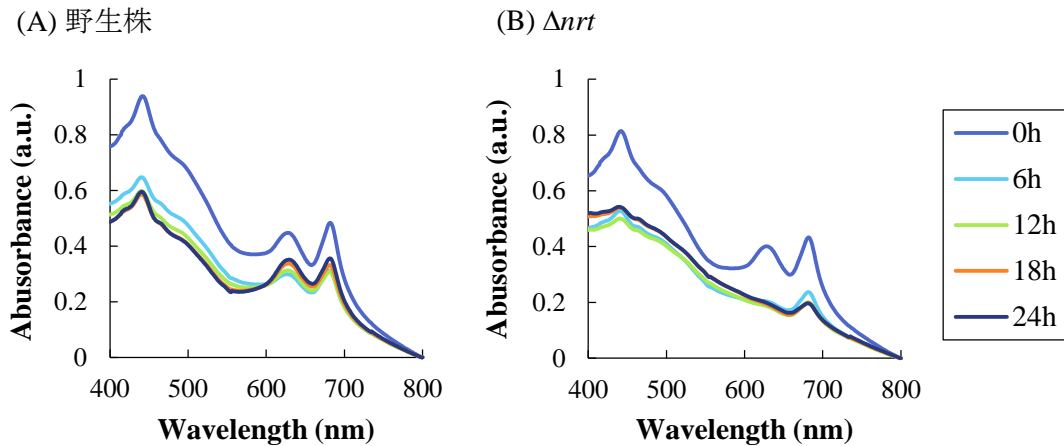


Fig. 4-10 野生株と Δnrt の吸収スペクトルの比較.

phycobilisome を構成する phycocyanin の吸収極大は 630 nm, chlorophyll *a* の吸収極大は 680 nm である. とともに Δnrt では野生株に比べてピークが減少した.

この培養では, 野生株と Δnrt の硝酸イオンの取り込み能の違いによって, 異なる細胞状態を構築できた. glycogen を野生株では消費, Δnrt では生産することからも, 両株の代謝系において炭素の分配が変化したのは明らかである. さらに炭素の分配状況を把握するために, 両株における炭素収支を考察した (Fig. 4-11). この収支の算出には, *Synechocystis* は培地中に CO_2 以外の代謝物質を分泌しない (Young *et al.*, 2011), 菌体の

乾燥重量のうち C の重量比は 49.8% である (Kim *et al.*, 2010) という前提を用いた。その結果、野生株細胞は取り込んだ CO_2 に加えてその 11% にあたる炭素を glycogen の資化によって供給したことがわかった。一方 Δnrt 細胞は取り込んだ CO_2 の 9% を glycogen 生産に使用し、残りの炭素を用いてバイオマスを合成した。

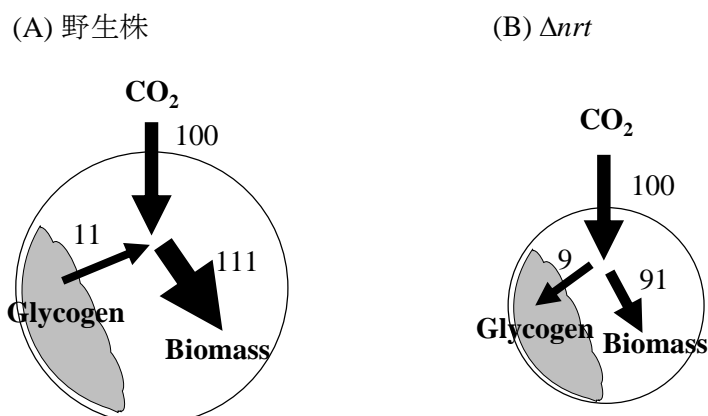


Fig. 4-11 野生株 (A) および Δnrt (B) の炭素のバランス。
 CO_2 の正味の取り込み速度を 100 として規格化した。

4-3-4 ^{13}C 標識実験による代謝フラックスの解析

4-3-4-1 培養の再現性

4-3-3 と同じ条件でフォトバイオリアクターによる培養を行い、 ^{13}C 代謝フラックス解析を行った。代謝フラックス解析のために培養を再度行った理由は 2 点あり、1 点目は ^{13}C 添加後に CO_2 の供給を停止することで時間が経つと培養系が破壊されるため、2 点目としては ^{13}C 標識パターンの経時変化を測定するためのサンプリングに大量の培養液が必要なためである。培養結果を 4-3-3 の 1 回目の培養結果と比較して Fig. 4-12 に示す。この実験では、 ^{13}C 標識パターンの測定に必要な培養液量が大きくなるため、比速度の算出に必要な時間範囲でのみ各量の測定を行った。また野生株では 1 回目の培養では取得していない 12 h においてサンプリングを行った。培養の結果、両株において菌体濃度の変化は再現し、算出した比増殖速度も近い値となった (Table 4-4)。野生株の glycogen 濃度は、新たに取得した 12 h では、15 h 以降に見られる単調減少からは外れた。これは結果が再現しなかったのではなく、細胞は 15 h 前後で代謝状態が異なっていたと考えられる。よって野生株の glycogen 比消費速度は、15-18 h の 2 点間で算出したが、1 回目の培養結果と大きく異ならなかった。 Δnrt については glycogen 生産も概ね再現したことが確認できた。

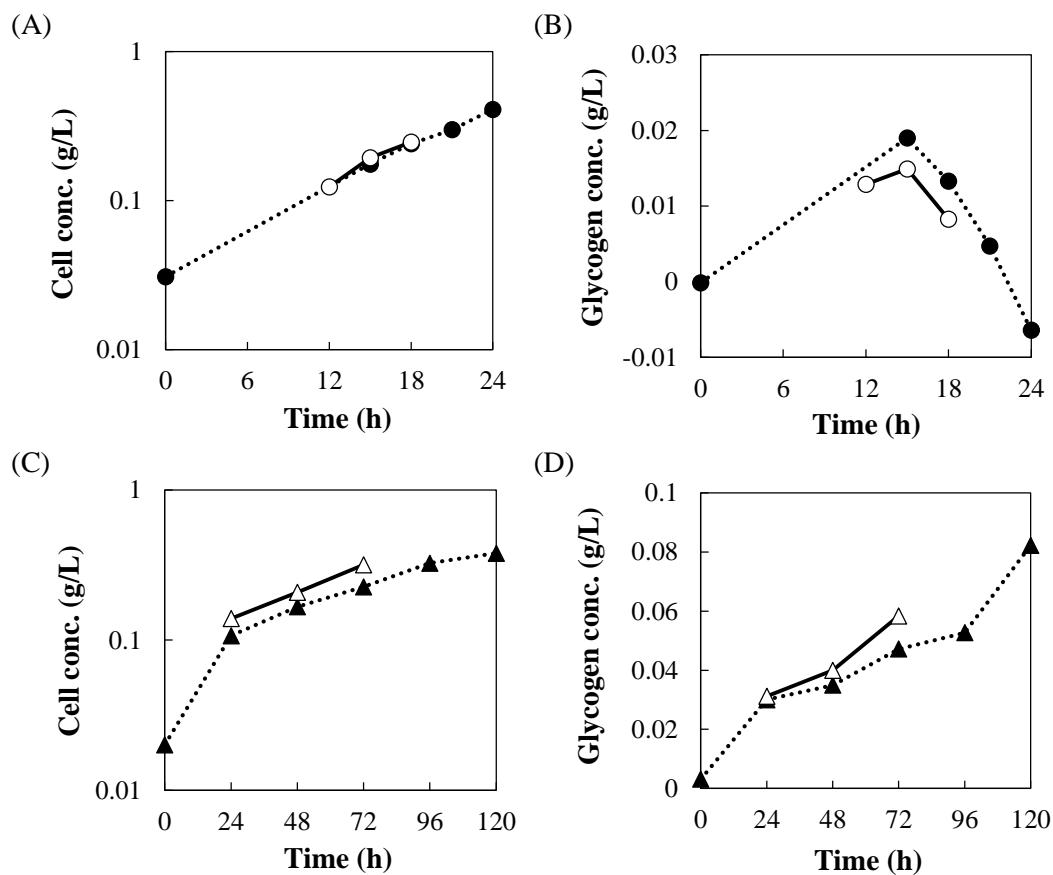


Fig. 4-12 菌体濃度及び glycogen 濃度の経時変化.

野生株の菌体濃度 (A), 野生株の glycogen 濃度 (B), Δnrt の菌体濃度 (C), Δnrt の glycogen 濃度 (D) を示す. クローズドシンボル (●, ▲) が 4-3-3 における 1 回目の培養結果, オープンシンボル (○, △) が 2 回目の培養を示す. サークルが野生株 (●, ○), トライアングルが Δnrt (▲, △) を表す. ここで示す菌体とは glycogen を含まないバイオマス成分である. 算出には各点において OD_{730} , 乾燥菌体重量 (gDCW/ OD_{730} /L, Table S-5) を乗じた値から, glycogen 濃度 (g/L) を引くことによって算出した. glycogen 濃度は培養液の体積あたりの glycogen 存在量を示している. 実際には glycogen は細胞内に蓄積されている. glycogen 濃度は測定手法の誤差のためわずかに負の値が存在している.

Table 4-4 培養結果から算出された比速度.

株	比増殖速度 (1/h)		glycogen 比生産速度 (mg-glycogen/gDCW/L)	
	1回目	2回目	1回目	2回目
野生株	0.089	0.082	-10.1	-10.2
Δnrt	0.015	0.017	1.6	2.7

1回目の培養では比速度は野生株は 15-21 h, Δnrt では 24-96 h の時間範囲で算出した.

2回目の培養では野生株は 15-18 h, Δnrt では 24-72 h の範囲で比速度を算出した.

4-3-4-2 代謝物質プール量の測定結果

^{13}C を培養液に添加する直前にサンプリングを行い, CE-MS を用いたメタボローム解析により 2 株の細胞内の中間代謝物質のプール量を測定した (Fig. 4-13).

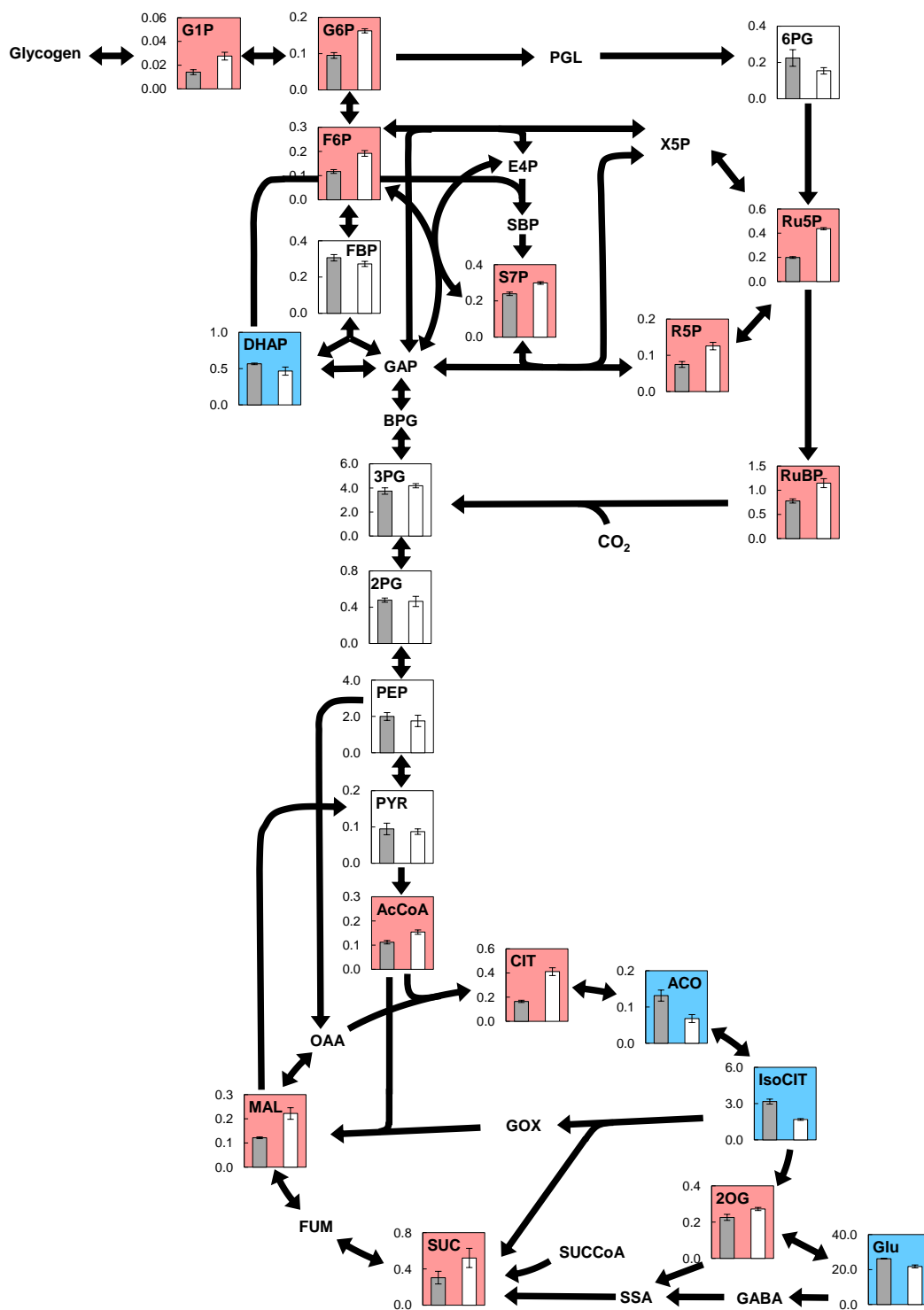


Fig. 4-13 中間代謝物質のプール量測定結果.

灰色のバーが野生株，白色が Δnrt を示す．縦軸はプール量 ($\mu\text{mol/gDCW}$) であり，エラーバーは3回の分析の標準偏差である．2株間で有意差がない代謝物質はグラフの背景を白で表示した ($p < 0.05$, 両側 t 検定)．野生株に比べて Δnrt でプール量が増加した代謝物質は，グラフの背景を赤で，減少したものは青で示した．

4-3-4-3 ^{13}C 標識パターンの測定結果

指数増殖中期である，培養開始から野生株は 18 h， Δnrt は 72 h においてそれぞれ ^{13}C 標識 NaHCO_3 を培養液へ投入し， ^{13}C 標識実験を開始した． ^{13}C 添加直前と， ^{13}C 添加 30, 60, 90, 120, 180, 300, 600 sec 後にサンプリングを行い，菌体抽出サンプルを GC-MS および LC-MS/MS 分析に供し MDV を測定した． Δnrt は 300 sec までのサンプルを分析した．

GC-MS 分析によって測定した代謝物質およびそのフラグメントの MDV を Fig. 4-14 に示す．LC-MS/MS 分析の結果を Fig. 4-15 に示す．GC-MS 分析ではアミノ酸と有機酸，一部の糖リン酸を主な分析対象とし，LC-MS/MS 分析では主に糖リン酸を分析対象とした．

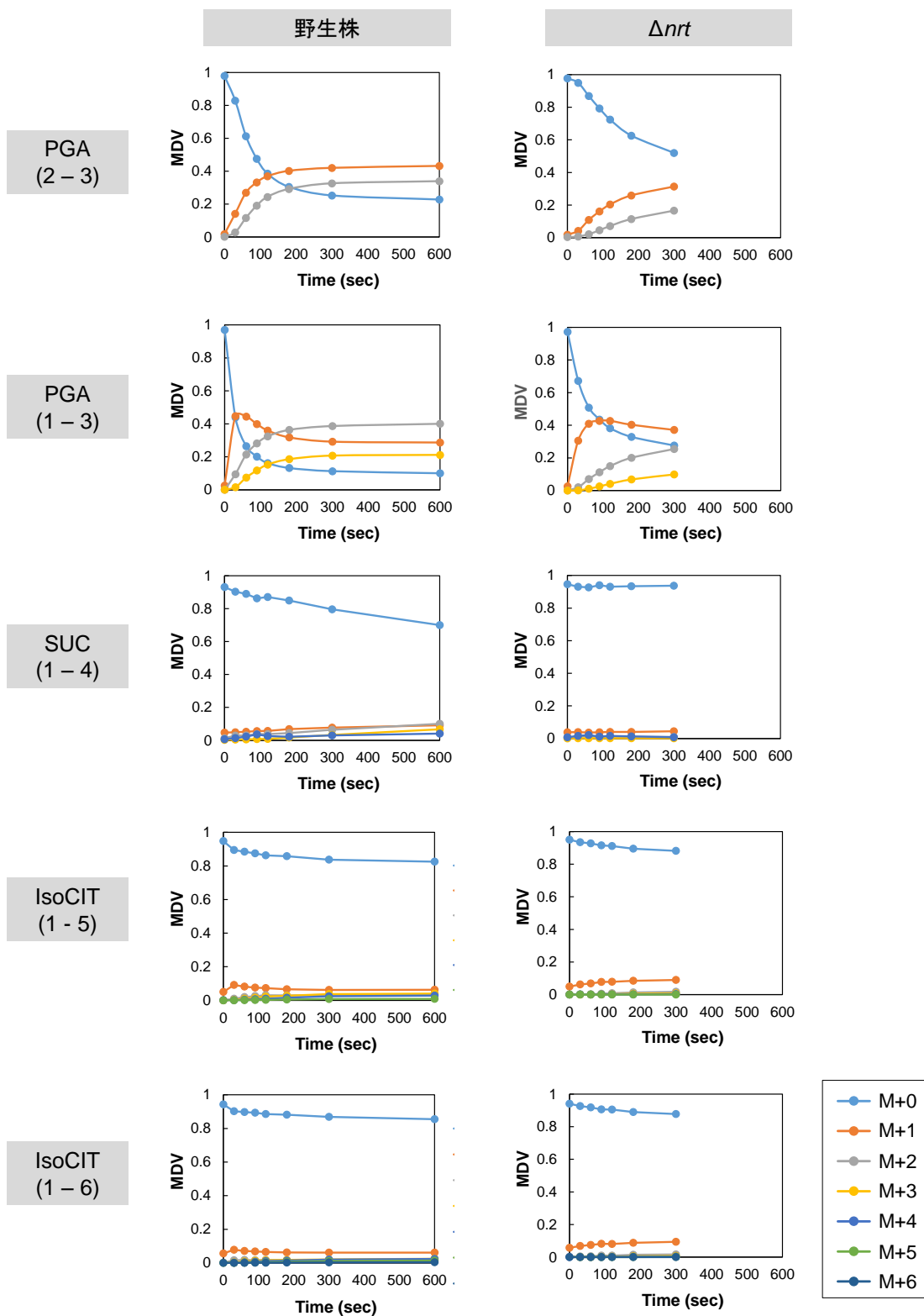


Fig. 4-14 GC-MS で測定した各代謝物質の MDV の経時変化。
 代謝物質名の括弧はフラグメントイオンが持つ骨格炭素の番号を示している。データは全て天然同位体比補正済み。

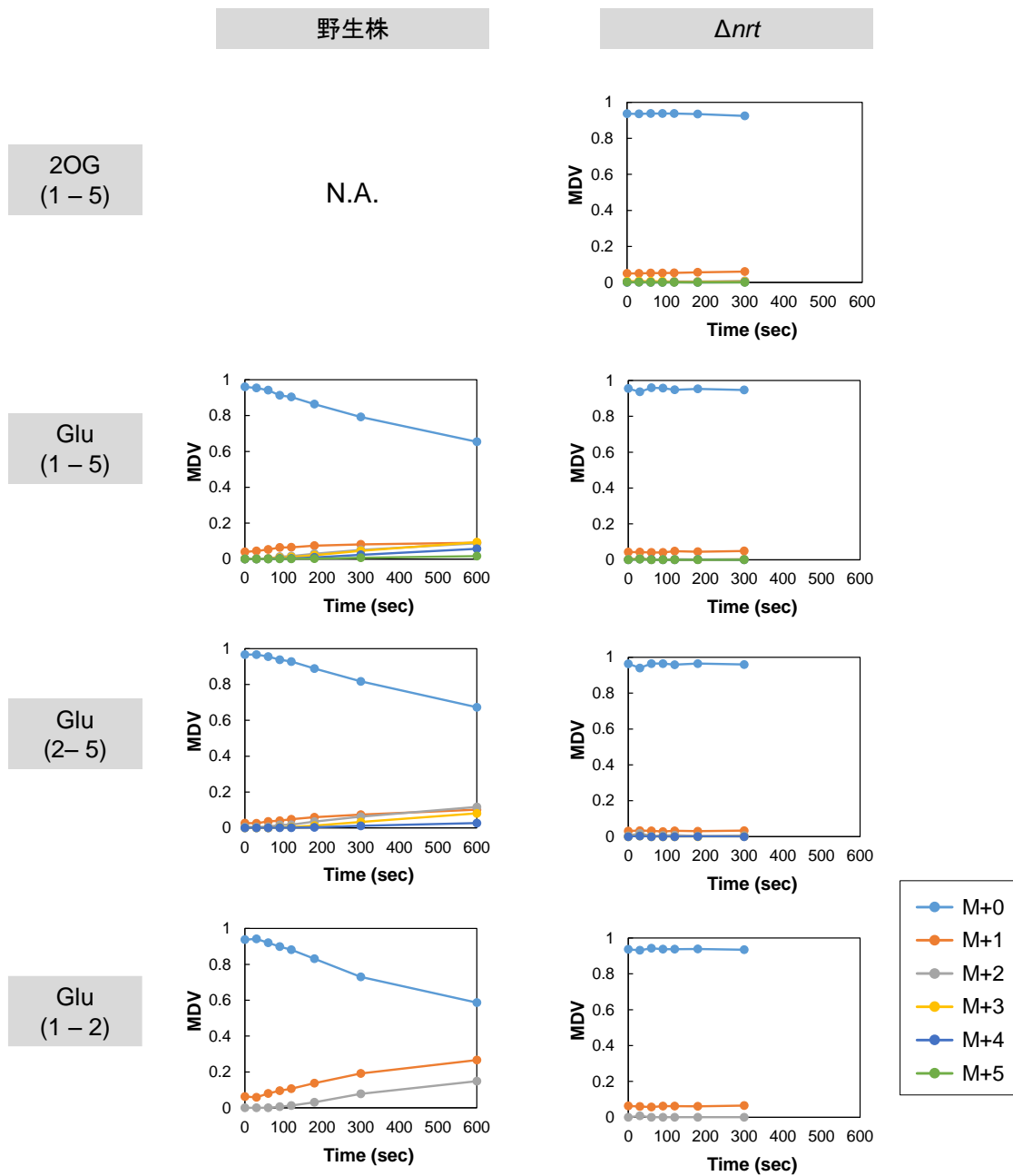


Fig. 4-14 GC-MS で測定した各代謝物質の MDV の経時変化 (続き). 代謝物質名の括弧はフラグメントイオンが持つ骨格炭素の番号を示している. データは全て天然同位体比補正済み. 野生株は 2OG のデータが取得できていない.

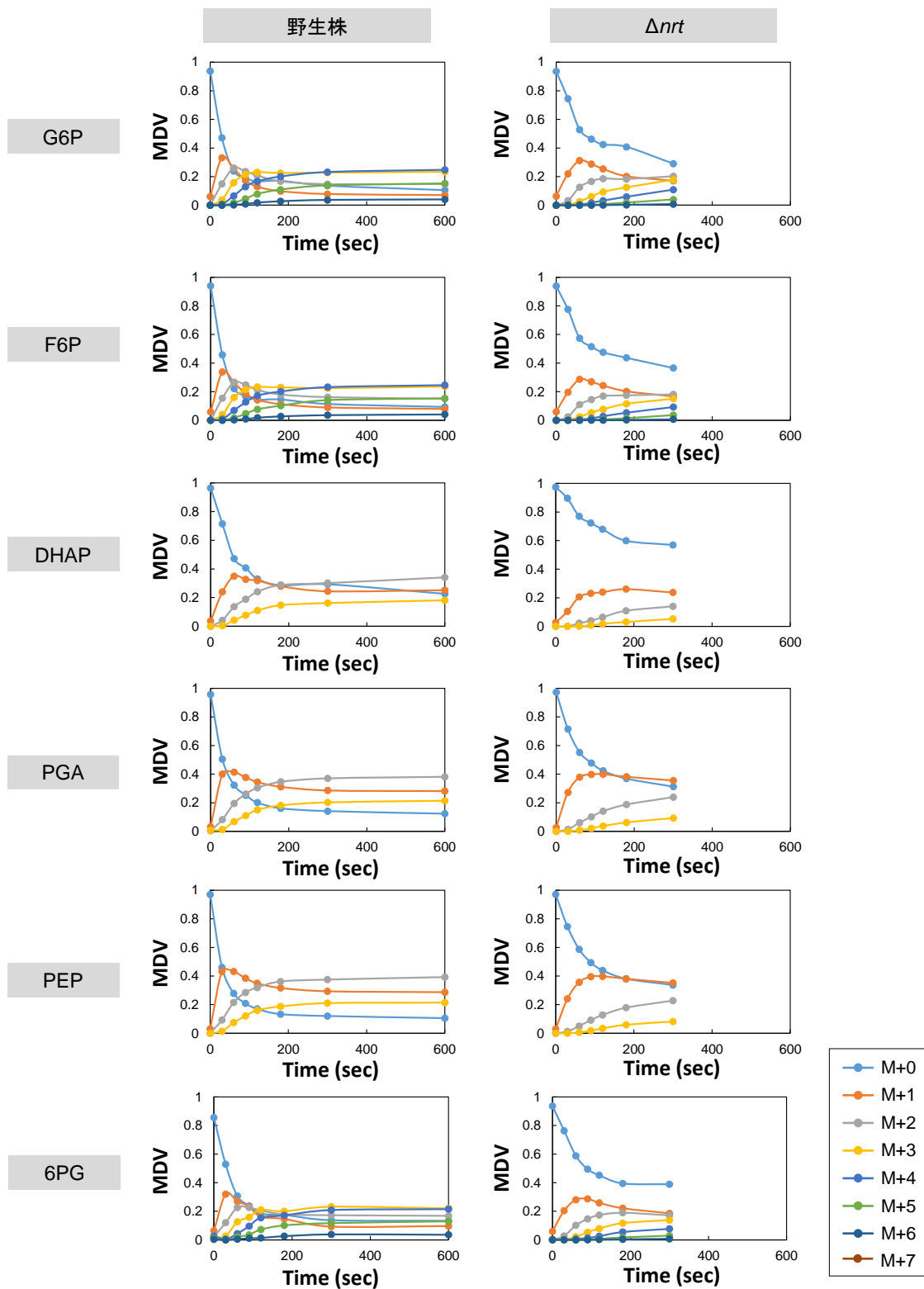


Fig. 4-15 LC-MS/MS で測定した各代謝物質の MDV の経時変化。
データは全て天然同位体比補正済み。

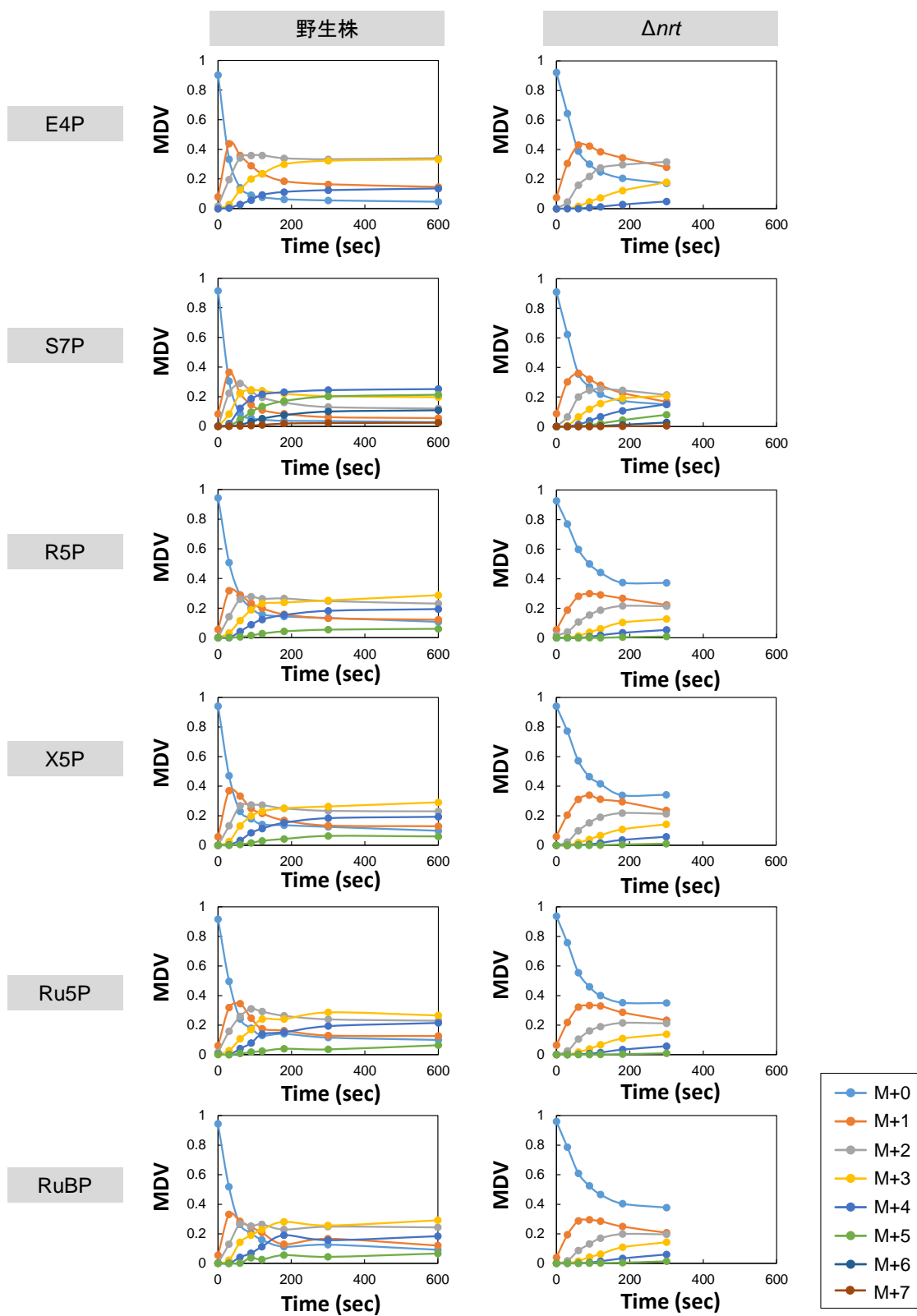


Fig. 4-15 LC-MS/MS で測定した各代謝物質の MDV の経時変化 (続き).

Fig. 4-14, Fig. 4-15 に示す MDV データより, 平均 ^{13}C 濃縮度を算出した (Fig. 4-16). 2 株間で CO_2 の取り込み速度, CO_2 の MDV がそれぞれ異なるため, 単純に比較するのは難しい. 標識の順序に注目すると, 両株ともに PGA, PEP の標識が速く, 続いてカルビンサイクルの中間体である S7P, X5P, R5P, Ru5P, RuBP, F6P, その後に G6P, OPP 経路の中間体である 6PG が標識され, TCA サイクルの代謝物質は中央代謝上流の代謝物質に比べて標識が非常に遅いことが分かる.

カルビンサイクルの中間代謝物質である E4P は, PGA, PEP といった CO_2 固定反応直下の物質よりも速く ^{13}C 標識された. また DHAP はカルビンサイクルにおいて F6P や S7P の上流に位置するが, ^{13}C 標識の順序が逆転している. さらに IsoCIT は, MS 分析においてピーク形状が乱れており, IsoCIT から合成される Glu よりも平均 ^{13}C 濃縮度が大きくなった (Fig. 4-16). そこで, これらの代謝物質についてはデータが正確ではないと判断し, 以降の議論には用いなかった.

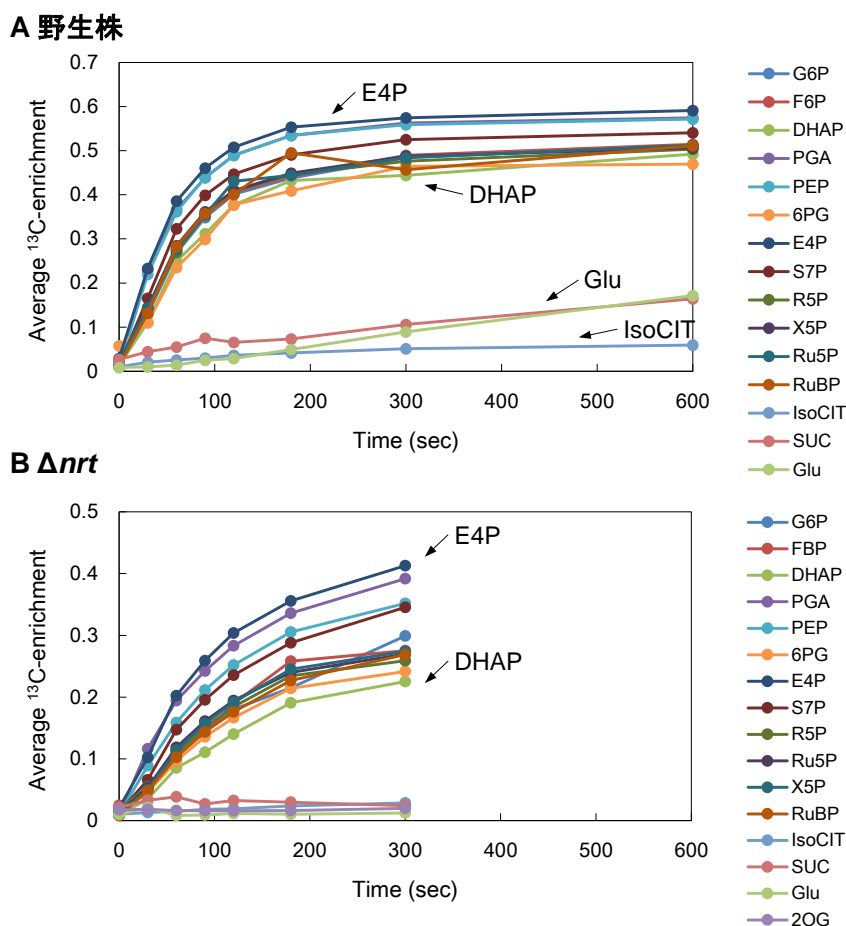


Fig. 4-16 各代謝物質の平均 ^{13}C 濃縮度の経時変化.

各代謝物質の持つ炭素が平均してどの割合で ^{13}C 標識されているかを示す. 炭素数 n の代謝物について, 平均 ^{13}C 濃縮度 = $1/n \cdot \sum_{i=1}^n (\text{MDV}[i] \times i)$ で算出される. 上段のグラフが野生株 (A), 下段が Δnrt である (B). 横軸は ^{13}C 添加後の時刻を示す.

4-3-4-4 代謝フラックス分布の算出

測定した代謝物質の MDV データに対して、代謝フラックス分布および代謝物質プール量、CO₂ の MDV のフィッティングを行った。フィッティングに使用した MDV データを Table 4-5 に示す。代謝物質プール量を一律に変化させる倍率 β (3-2-1-4 参照) は、フィッティングパラメータにした場合としない場合でフィッティング後の SSR (残差二乗和) は大きく変化しなかった。 β をパラメータとした場合、フィッティング後のプール量推定値は実測値から大きく変化した。そこで実測したプール量に近い推定値の方がより正確な推定結果であると判断し、本章では $\beta = 1$ に固定してフィッティングを行った結果を示す。フィッティング後の代謝フラックス分布を Fig. 4-17 に、実測 MDV データおよび代謝物質プール量とフィッティング後の推定値の対応を Fig. 4-18~4-21 に示す。

Table 4-5 フィッティングに使用した MDV データ.

分析装置	代謝物質	炭素骨格
LC-MS/MS	G6P	1-2-3-4-5-6
	F6P	1-2-3-4-5-6
	6PG	1-2-3-4-5-6
	S7P	1-2-3-4-5-6-7
	R5P	1-2-3-4-5
	X5P	1-2-3-4-5
	Ru5P	1-2-3-4-5
	RuBP	1-2-3-4-5
	PGA	1-2-3
	PGA	2-3
	PEP	1-2-3
	GC-MS	SUC
2OG*		1-2-3-4-5
Glu		1-2-3-4-5
Glu		2-3-4-5

*2OG は野生株では測定できていないため、 Δnrt の代謝フラックス算出にのみ使用した。

A 野生株

B Δnrt

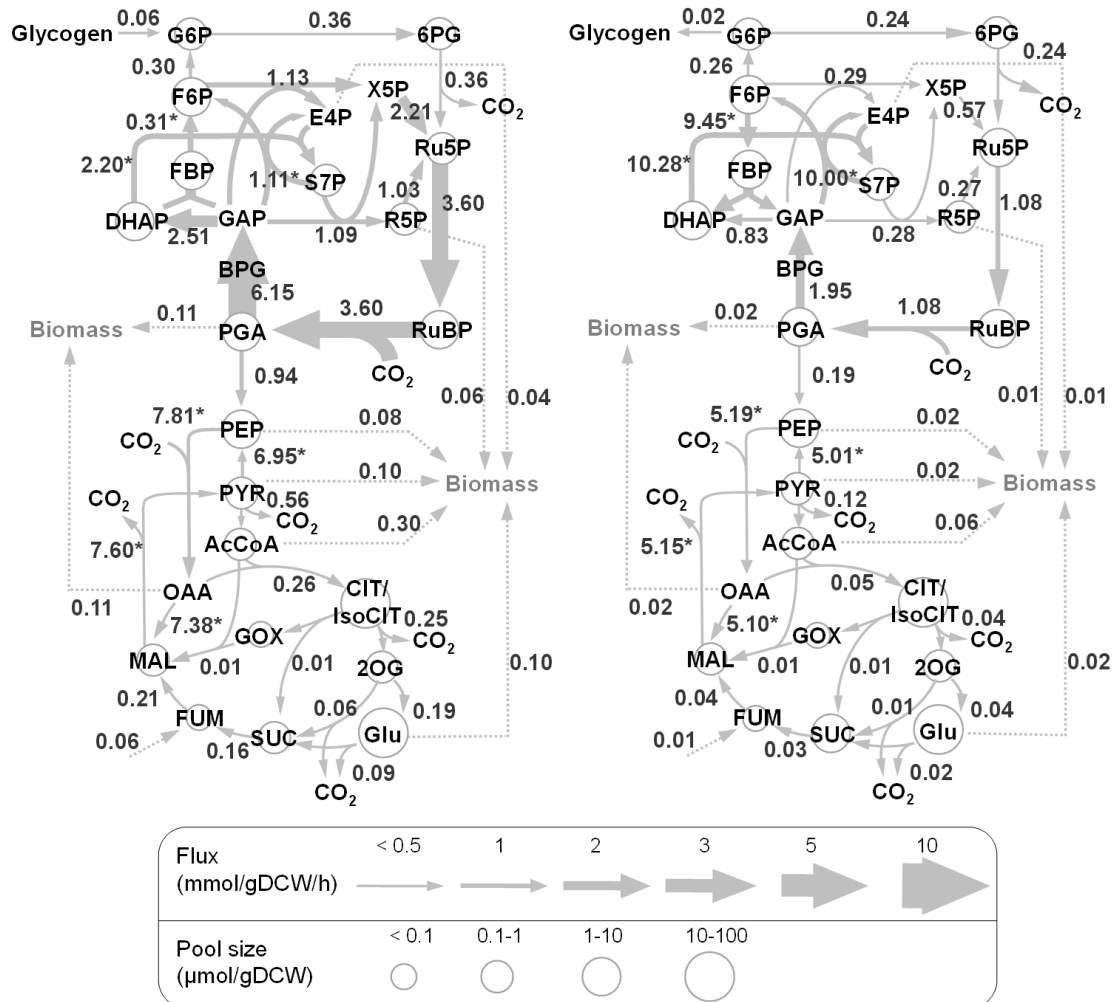


Fig. 4-17 野生株 (A) および Δnrt (B) の代謝フラックス解析結果.

数字は代謝フラックス値を示し, 反応の矢印の幅が代謝フラックスの大きさに対応している. 点線はバイオマス合成へ向かう炭素フローである. 代謝物質名に重なる円の大きさはその代謝物質のプール量に対応している. アスタリスクを付けた反応は正確なフラックス推定ができていない可能性が高く (Fig. 2-18), 矢印の幅と代謝フラックスの値と関連付けていない.

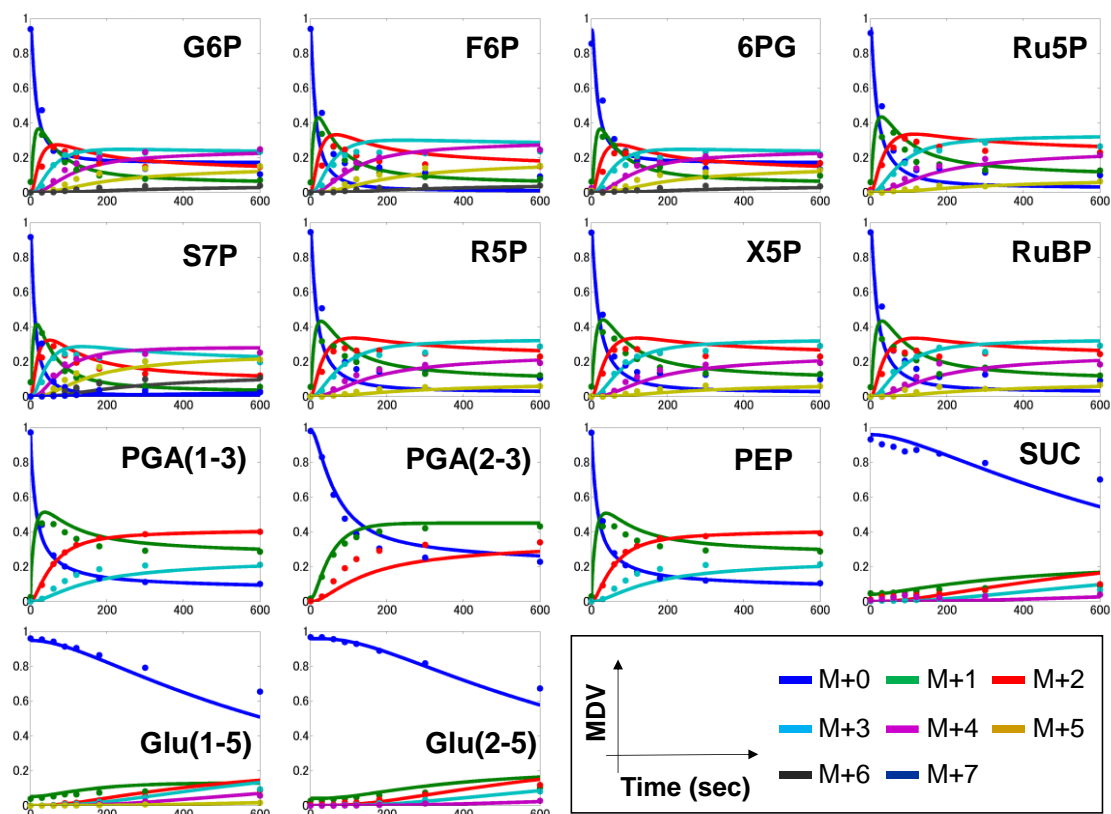


Fig. 4-18 野生株の実測 MDV データとフィッティング後の推定値の対応。点は実測 MDV，線はフィッティング後の代謝フラックス分布および代謝物質プール量から推定される MDV の経時変化である。M は各代謝物質の質量数である。代謝物質名の後の括弧は、フラグメントイオンが持つ骨格炭素の番号を示す。

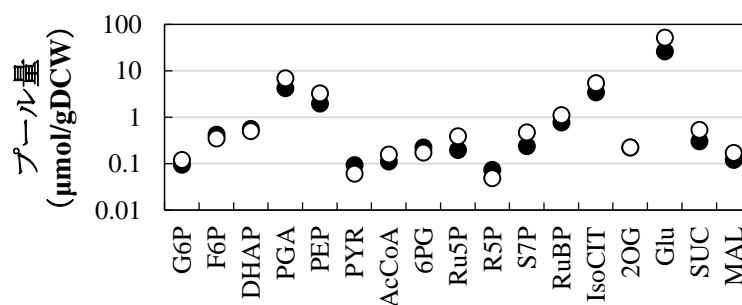


Fig. 4-19 野生株の実測代謝物質プール量とフィッティング後の推定値の対応。実測値 (●) およびフィッティング後の推定値 (○) を示す。使用した代謝モデル (Fig. 4-3) は一部代謝経路を簡略化しており、例えば、モデル中の“F6P”のプール量は F6P と FBP のプール量を合算したものである。PGA, IsoCIT も同様である。

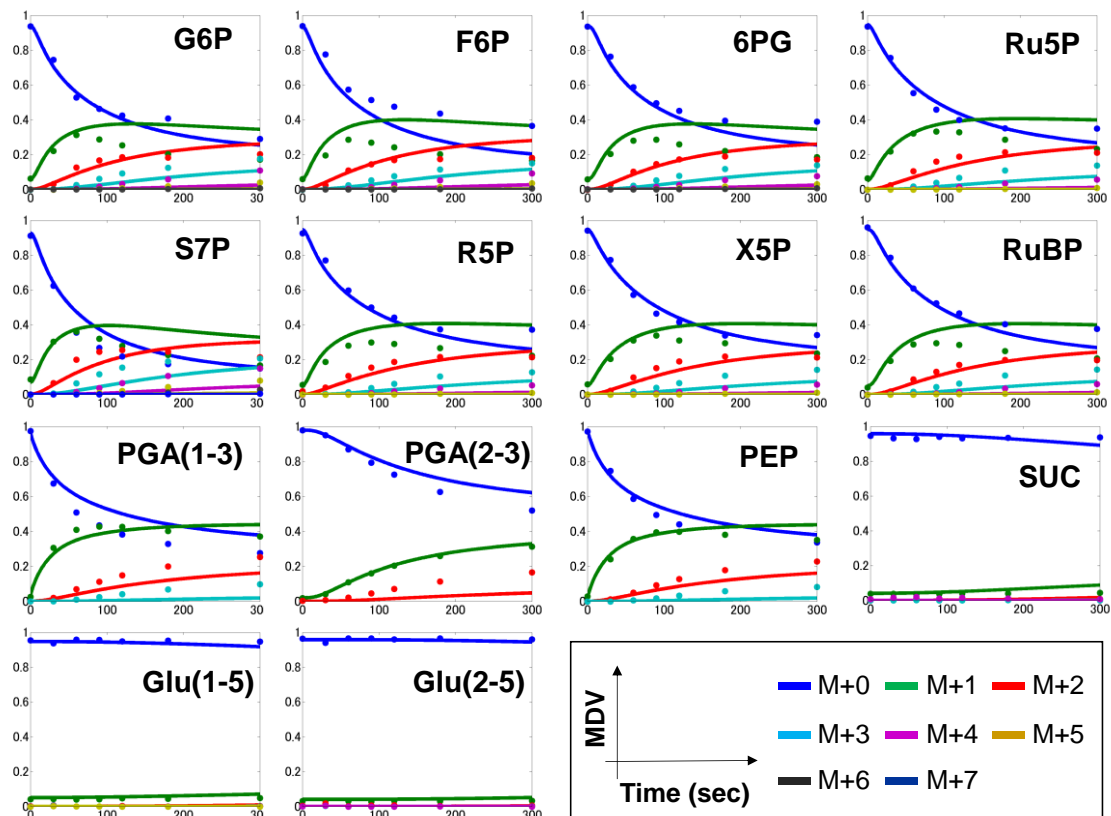


Fig. 4-20 Δnrt の実測 MDV データとフィッティング後の推定値の対応。
 点は実測 MDV，線はフィッティング後の代謝フラックス分布および代謝物質プール量から推定される MDV の経時変化である。M は各代謝物質の質量数である。代謝物質名の後の括弧は、フラグメントイオンが持つ骨格炭素の番号を示す。

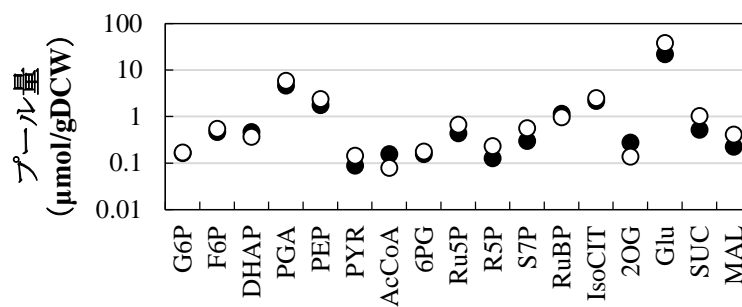


Fig. 4-21 Δnrt の実測代謝物質プール量とフィッティング後の推定値の対応。
 実測値 (●) およびフィッティング後の推定値 (○) を示す。

4-3-4-5 窒素制限条件における代謝フラックス分布の変化

代謝フラックス解析の結果、野生株と Δnrt において RuBisCO における CO₂ 固定フラックスに差が見られた（野生株, 3.60 mmol/gDCW/h ; Δnrt , 1.08 mmol/gDCW/h). また Δnrt の RuBisCO フラックスの低下が野生株の 1/3 程度に留まったにも関わらず, Δnrt の比増殖速度が野生株の 1/5 以下に低下したことは (Table 4-4), Δnrt の炭素の利用効率が野生株に対して低下したことを示している. 本解析結果では, 2 株ともに OPP 経路に炭素フローが存在する (野生株, 0.36 mmol/gDCW/h ; Δnrt , 0.24 mmol/gDCW/h). RuBisCO による CO₂ 固定および glycogen からの炭素取り込みのうち OPP 経路で失う炭素の割合は野生株では 10%, Δnrt では 22%であった. Δnrt では野生株に比べて OPP 経路の代謝フラックスが大きくなったことで炭素の排出が増加し, CO₂ 固定速度の低下以上に菌体合成速度が減少したことが分かる.

また野生株では解糖系下流や TCA サイクルにも炭素フローが確認できるが, Δnrt ではこれらの経路の代謝フラックスは非常に小さくなった. 測定した MDV データからも, Δnrt では IsoCIT, Glu, SUC への ¹³C の流入が小さいことが確認できる (Fig. 4-14). PGA におけるカルビンサイクルと解糖系下流への代謝フラックスの分岐比は, 野生株で約 6.5:1 であったが, Δnrt は約 10:1 に変化した. Δnrt のカルビンサイクルに注目すると, PGA からの炭素の流出が減少した一方で, F6P から流出する炭素フローが大きくなった. F6P から流出した炭素フローは OPP 経路に流入し, CO₂ の排出を伴い再び Ru5P に変換されカルビンサイクルに合流する.

野生株において OPP 経路に若干の炭素フローが存在したことは第 3 章の結果と異なるが, その原因は本章の培養系において菌体あたりの照射光量が十分でなかったためと考えられる. 第 3 章では平板型のバイオリアクターを用いて *Synechocystis* を培養し代謝フラックス解析を行った. 平板型リアクターは光の照射方向に対して厚みが小さく設計されており, 細胞による光の遮蔽効果が低減されている. 本章で用いたのは円筒形のリアクターであり, 光の照射方向からの培養液の深度が大きい. リアクターの表面における光強度は第 3 章の 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ に比べて大きい 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ と設定したが, 結果として培養中の菌体あたりの光供給量は小さくなったと考えられる. そのため, 光化学系での NADPH 生産速度の低下によって, 細胞内の NADPH 減少を補填するために OPP 経路の代謝フラックスが増加したと考えられる. 野生株は glycogen を消費したが, エネルギー含有量の多い glycogen を資化することで, 細胞あたりの光エネルギー供給量の不足を補っている可能性もある.

本章では代謝フラックス解析によって, 窒素制限下において, 固定した炭素を OPP 経路に流入させる割合が高くなるという推定結果を得た. この結果をどのように検証できるかを考察する. OPP 経路の代謝フラックスの絶対値は, Δnrt では野生株に比べて小さくなった. CO₂ 固定反応に対する代謝フラックス比が変化したことを, 第 3 章で述べた

ように粗細胞抽出液を用いた酵素活性測定で検証するのは困難だろう。そこで別のアプローチとして、本研究では測定できていない、6PGの前駆体である6-phosphogluconolactone (PGL)のプール量を測定することが有効と考えられる。PGLのプール量を正確に測定することができれば、OPP経路の3反応のみからなる簡単な代謝モデルを用いて、確実性の高い推定が可能になると考えられる。PGLのプール量を測定できていない場合は、簡単なOPP経路モデルを用いても、PGLの未知のプール量によって6PGのMDVの変化を説明づけられるため、精度の高い代謝フラックス推定を行うことはできないと考えられる。

シアノバクテリアの窒素制限下での振る舞いは広く研究されているが、一般的には窒素を含まない培地を用いた窒素枯渇条件が用いられる。一方、本研究で用いた Δnrt は、微量ずつ窒素が細胞内に供給されると考えられ、窒素枯渇条件とは異なる。以下では、先行研究による窒素枯渇条件の*Synechocystis*の応答と、本研究の結果がどのように対応したかを述べる。

窒素を含む培地から窒素を含まない培地（窒素枯渇条件）に*Synechocystis*を移すと、移行後の時間によって細胞は様々な応答を見せる。Krasikovらによると、細胞の応答の時間範囲は大きく3つのフェーズに分けられる (Krasikov *et al.*, 2012) ; (i) 窒素枯渇条件へ移行後数時間以内の迅速な応答で、この時間範囲では生理的な変化は観察されにくい。遺伝子発現量の変化は確認できる、(ii) 移行後12 h以降の短期応答で、このフェーズで増殖速度が低下するとともに退色が始まる、(iii) 移行後数日が経過し、窒素源が完全に枯渇することで菌体は休止状態に移行し、細胞はほとんどの生理活動を停止させる。先行研究は、窒素枯渇条件へ移行後の様々な時間範囲に注目して行われている。例えばAzumaらやOsanaiら、Josephらは窒素枯渇後4 hや6 hといったフェーズiに相当すると考えられる時間範囲を主に解析対象としている (Azuma *et al.*, 2011 ; Joseph *et al.*, 2014 ; Osanai *et al.*, 2014)。KrasikovらやHasunumaらは窒素枯渇後の*Synechocystis*に対して、フェーズiからii, iiiへ至る経時的なトランスクリプトーム分析およびメタボローム分析をそれぞれ行った (Krasikov *et al.*, 2012 ; Hasunuma *et al.*, 2013)。

本研究で代謝フラックスを解析した Δnrt については、野生株に対して増殖速度が低下し (Fig. 4-8 A), glycogenの蓄積 (Fig. 4-8 B), phycobilisomeの分解による退色 (Fig. 4-9, Fig. 4-10) が観察された。これらは一般的に窒素枯渇条件で報告されている応答であり、窒素枯渇後のフェーズii以降の応答である。 Δnrt は硝酸濃度に依存した生育を見せたことから (Fig. 4-6, Fig. 4-7) 拡散によって硝酸イオンを培地中から取り込んでいると考えられ、光とCO₂の供給量を大きくすると、少なくとも100 h程度は指数増殖を継続可能なことが分かった (Fig. 4-8 A)。このことから、解析した Δnrt はフェーズiiiの休止状態ではなく、フェーズiiに近い状態を長時間維持したと考えられる。そこで、本研究で解析した Δnrt の代謝フラックス分布を、窒素枯渇条件のフェーズiiに相当する時間

範囲で測定された遺伝子発現量 (Krasikov *et al.*, 2012 ; 窒素枯渇条件移行後 24 h) と代謝物質プール量 (Hasunuma *et al.*, 2013 ; 窒素枯渇条件移行後 36 h) と比較し, 議論を行う.

窒素枯渇条件では, 活性化した転写因子 NtcA により, シグマ因子 SigE およびレスポンスレギュレータ Rre37 の発現量が増加し, それらが独立して glycogen の分解 (*glgX*, *glgP*) および合成経路遺伝子 (*glgA*, *glgC*), 解糖系で異化方向に働く酵素遺伝子 (*gap1*, *pfkA*), OPP 経路の酵素遺伝子 (*zwf*, *gnd*) の発現量を上方制御することが知られている (Joseph *et al.*, 2014 ; Fig. 4-22). Krasikov らのトランスクリプトーム分析結果においても, *sigE*, *rre37* の発現量は増加し, 異化方向の代謝反応に関わる *glgX*, *glgP*, *pfkA*, *gap1*, *zwf*, *gnd* の発現量は大きく上昇した (Krasikov *et al.*, 2012). 一方で, glycogen 合成酵素の遺伝子である *glgC* の発現量は低下傾向にあった (Krasikov *et al.*, 2012).

本研究の Δnrt の代謝フラックス解析の結果より, 代謝フラックス変化が遺伝子発現量変化と相関する経路と, そうでない経路が確認された. Δnrt では, カルビンサイクルの代謝フラックスは小さくなった. これは *pfkA*, *gap1* の発現増強によって, 解糖系の同化方向の炭素フローを弱めたと考えることができる. また, Krasikov らのトランスクリプトームデータによればカルビンサイクルに関わる遺伝子の発現量は窒素枯渇条件において大きく低下しており (Krasikov *et al.*, 2012), その影響も寄与したと考えることができる. 一方で, 窒素制限下で遺伝子発現量が上昇する OPP 経路については, 代謝フラックスは野生株に比べて小さくなった. しかし CO_2 取り込みフラックスに対して相対的に OPP 経路に流入する炭素フローの割合は, Δnrt では野生株に比べて上昇した. また glycogen の異化経路の遺伝子発現量が上昇し, glycogen 合成経路の合成経路の遺伝子発現量が低下する (Krasikov *et al.*, 2012) にも関わらず, glycogen の実際の生産が確認された. これまでにも窒素枯渇条件で glycogen の蓄積と, 異化に関わる遺伝子 (*pfkA*, *gap1*, *zwf*, *gnd*) の発現量が増加するという矛盾が指摘されている (Osanai *et al.*, 2014). 本研究で得た代謝フラックス分布は, 先行研究と実験条件が同じではないが, この矛盾を説明する代謝フラックス分布を示したと考えられる. すなわち, カルビンサイクルの酵素遺伝子の発現量低下と, *pfkA*, *gap1* の発現量増強によってカルビンサイクルの代謝フラックスが低下した. さらにカルビンサイクルの代謝フラックスは F6P の下流で小さくなるため, Δnrt の Pgi 反応 ($\text{F6P} \rightarrow \text{G6P}$) の代謝フラックスが相対的に大きくなり, glycogen 合成および OPP 経路に炭素を供給したと考えられる. 炭素のバランスによって, 発現量変化と代謝フラックスの変化が対応しない経路が存在したのだろう. また Δnrt において解糖系上流の代謝物質 (G6P, F6P) のプール量が増加したが, この傾向は Hasunuma らの研究結果とも一致した (Hasunuma *et al.*, 2013).

解糖系下流においては, 窒素枯渇条件下で $\text{PEP} \rightarrow \text{PYR}$ の反応は酵素遺伝子の発現量が増加するが, $\text{PYR} \rightarrow \text{AcCoA}$ 反応の酵素遺伝子発現量は低下する (Krasikov *et al.*,

2012). Δnrt の代謝フラックス解析の結果, 解糖系下流 (PGA \rightarrow AcCoA) および TCA サイクルの代謝フラックスは野生株に比べて大きく低下したことが分かった. PYR \rightarrow AcCoA 反応の発現低下が影響した可能性があるほか, 細胞内の NH_4^+ 濃度の低下による 2OG \rightarrow Glu 反応の代謝フラックスの低下が原因と考えられる. 細胞内に取り込まれた NO_3^- は NH_4^+ に還元され, NH_4^+ は glutamine (Gln) を経由して GS-GOGAT 経路により炭素代謝に合流する. GS-GOGAT 経路は glutamine synthetase (GS) による $\text{Glu} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{Gln}$ という反応と glutamine oxoglutarate amidotransferase (GOGAT) が触媒する $\text{Gln} + 2\text{OG} \rightarrow 2\text{Glu}$ の反応からなり, 正味の反応としては $2\text{OG} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{Glu}$ である. GS-GOGAT 経路の代謝フラックス低下によって, 2OG が蓄積したと考えられる (Fig. 4-13; Schwarz and Forchhammer, 2005). また, IsoCIT \rightarrow 2OG 反応を触媒する IsoCIT dehydrogenase (ICD) の遺伝子発現量は NtcA によって上方制御されることが知られている (Muro-Pastor *et al.*, 1996). Krasikov らの測定でも, 窒素枯渇条件において *icd* の遺伝子発現量が大きく上昇することが確認された. これは 2OG の蓄積と, IsoCIT のプール量減少に寄与したと考えられる. IsoCIT のプール量減少は Hasunuma らのメタボローム分析結果でも確認されている. 一方で, AcCoA, CIT, SUC のプール量変化は Hasunuma らの先行研究とは傾向が一致しなかった.

野生株に対する Δnrt の代謝フラックス分布の変化は, 窒素枯渇条件のフェーズ ii で取得された遺伝子発現量変化によって説明できる経路とそうでない経路が存在することが分かった. 第 2 章で述べたように, 代謝遺伝子の発現量変化は必ずしも対応する代謝フラックスの変化をもたらすとは限らないと考えられる. 本研究で代謝フラックス解析が適用可能な窒素制限系として用いた Δnrt は, glycogen 蓄積や退色, 増殖速度の低下を見せ, その細胞状態は一般的な窒素枯渇条件における大きくは異ならないことが示唆される. そこで, Δnrt の代謝フラックス解析結果は, 広く研究されている窒素枯渇条件での細胞応答の解明に資するものと考えられる.

増殖速度の低下と OPP 経路の代謝フラックス増大は, 第 2 章で従属栄養条件においても観察された現象である. しかしその因果関係は逆転していると推測される. 従属栄養条件では, 光合成電子伝達系が阻害されたため, NADPH を合成するために OPP 経路の代謝フラックスが大きくなったと考えられる. つまりこの仮説では, 従属栄養条件における増殖速度の低下は, NADPH あるいは ATP が炭素代謝によって供給される速度によって制限された. 一方で, 本章における増殖速度の低下の原因は, 窒素源の供給速度の減少であると考えられる. 増殖速度が低下した結果, 炭素の供給が過剰となり, OPP 経路に炭素フローを持たせることで, 余剰の炭素を CO_2 として排出したと考察した.

窒素制限条件において, OPP 経路の酵素が遺伝子発現レベルで制御されることは知られている. そのため, 窒素制限条件下であっても NADPH を供給するなど, 細胞にとって利得がある可能性がある. 例えば, アンテナタンパク質の分解によって, 光合成明反

応の活性が低下し、窒素制限下でも NADPH など補酵素の欠乏が原因で増殖が低下する可能性を否定できない。窒素制限下の OPP 経路の役割を確認するには、OPP 経路の破壊株の培養挙動を確認すれば良いだろう。OPP 経路の代謝フラックス増大が炭素のバランスを保つ役割をしている場合は、OPP 経路の破壊によって増殖速度は低下せず、glycogen の蓄積が促進される、あるいは他の代謝物質がオーバーフローし培地中に分泌されるといった挙動が観察できると推測される。一方 OPP 経路が NADPH 生産に寄与し、その炭素フローの大きさが増殖速度を制限している場合は、OPP 経路の破壊によって増殖速度が低下すると推測される。

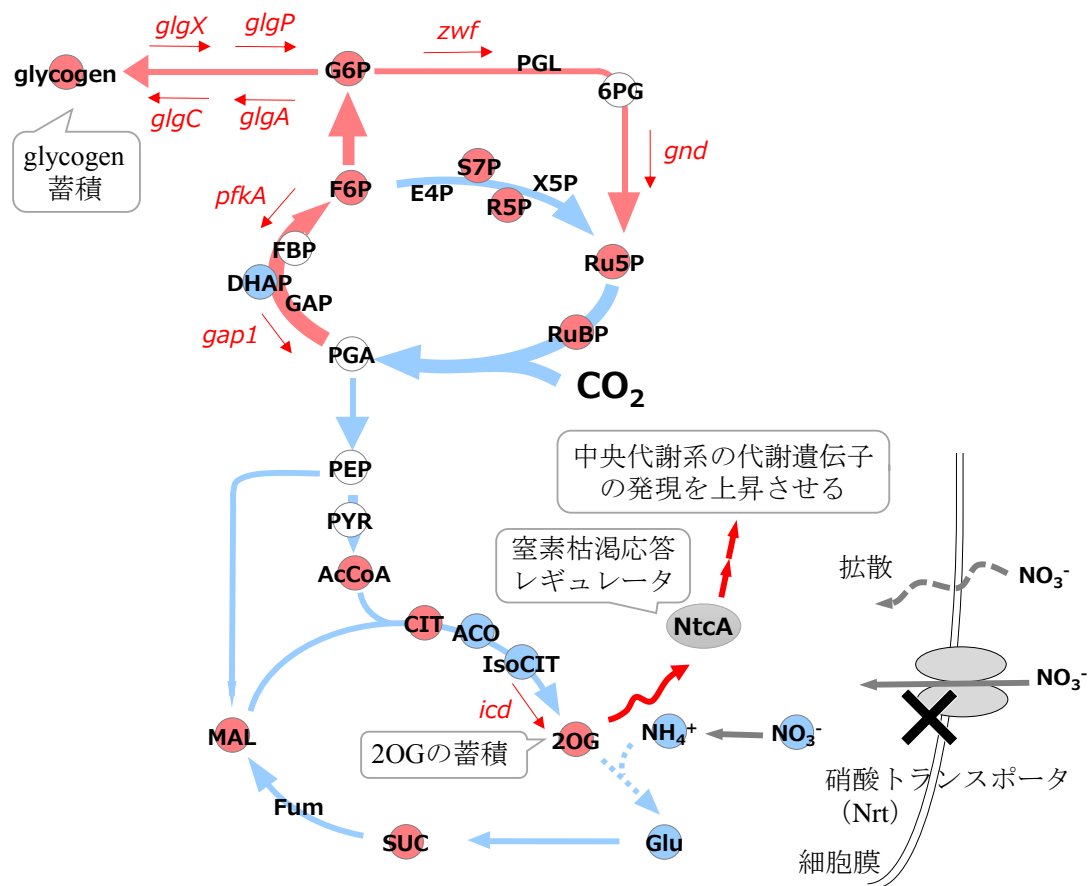


Fig. 4-22 窒素制限下における中央代謝の変化.

RuBisCO 反応による CO_2 取り込みに対する相対的な代謝フラックスが、 Δnrt において野生株よりも大きくなった場合は矢印を赤で、小さくなった場合は青で示す。代謝物質名に重なる円の色が代謝物質プール量の変化を示しており、赤は野生株と比べて Δnrt でプール量が増加した代謝物質、青はプール量が低下した代謝物質、白はプール量に変化がなかった代謝物質を示す。メタボロームデータの詳細は Fig. 4-13 に示した。また、これまでに遺伝子発現制御が明らかになっているものを図中に示した。赤色の遺伝子名は遺伝子発現量が上方制御されるものであり、遺伝子名の脇の矢印はその遺伝子がコードする酵素が触媒する反応の方向を示す。

4-3-4-6 物質生産に向けた考察

以上の結果を踏まえ、窒素制限条件における物質生産について議論を行う。

Nrt を破壊することによる窒素制限条件では、CO₂ 取り込み速度に対して菌体合成速度が相対的に低下し、物質生産において生産物の収率増加につながる代謝状態であることが示された。Δnrt の絶対的な CO₂ 取り込み速度は野生株に劣るため、実生産に用いる場合は菌体濃度を高く保つなどの工夫が必要だろう。また、現状では余剰の炭素は主に CO₂ として排出されるため、この炭素をうまく目的物質に分配するような代謝改変が必要となる。窒素を制限すると、Pgi 反応 (F6P → G6P) によってカルビンサイクル中の炭素が流出するため、それらの代謝物質を前駆体とする sucrose や glycogen 生産に適していると考えられる。一方、窒素制限条件において PGA から解糖系下流へ流出する炭素フローは小さくなる。第3章の3-3-7で議論した butanol などように、PYR や AcCoA といった代謝物質を前駆体とする目的物質の場合は、代謝フラックス分布を大きく変化させる必要があるだろう。

第3章でも議論した butanol 生産を例として、代謝改変戦略について詳細に考察する。Fig. 4-23 に、野生株、Δnrt、および理想的な代謝フラックス分布を示す。Δnrt は、窒素制限によって比増殖速度がおよそ 1/5 に低下し、一方 RuBisCO による CO₂ 固定速度は 1/3 に低下した。よって、固定した CO₂ がバイオマス合成に使用される割合は低下した。一方で、Δnrt では glycogen 合成および OPP 経路の炭素フローは増加しており、butanol の生産収率を増加させるには、これら経路の炭素フローを低減しなければならない。それには、glycogen 合成経路や OPP 経路の遺伝子を破壊するか、F6P → G6P の反応を触媒する Pgi をコードする pgi 遺伝子を破壊する戦略が有効と考えられる。実際に glycogen 合成経路を破壊した *Synechocystis* は、窒素枯渇条件で炭素が PYR や 2OG として培地中に排出されることが報告されており (Carrieri *et al.*, 2012 ; Gründel *et al.*, 2012)、炭素のフローが中央代謝上流から下流へ転換することが予想される。また、butanol 生産収率を高めるためには、TCA サイクルへの炭素フローを削減しなければならない。*Synechocystis* 細胞に butanol 合成経路を組み込んだ上で、どの程度 TCA サイクルに炭素フローが存在するかを確認する必要があるだろう。バイオマス合成フラックスは野生株に比べて低下したが、Δnrt でも依然として取り込んだ CO₂ の約半分をバイオマス合成に使用している。これをさらに低減するには、培地中の硝酸イオン濃度を調整し、窒素制限の程度を強化すれば良いと考えられる。CO₂ 取り込み速度の低下に対して増殖速度の低下が大きければ、目的物質の生産収率を高められるだろう。

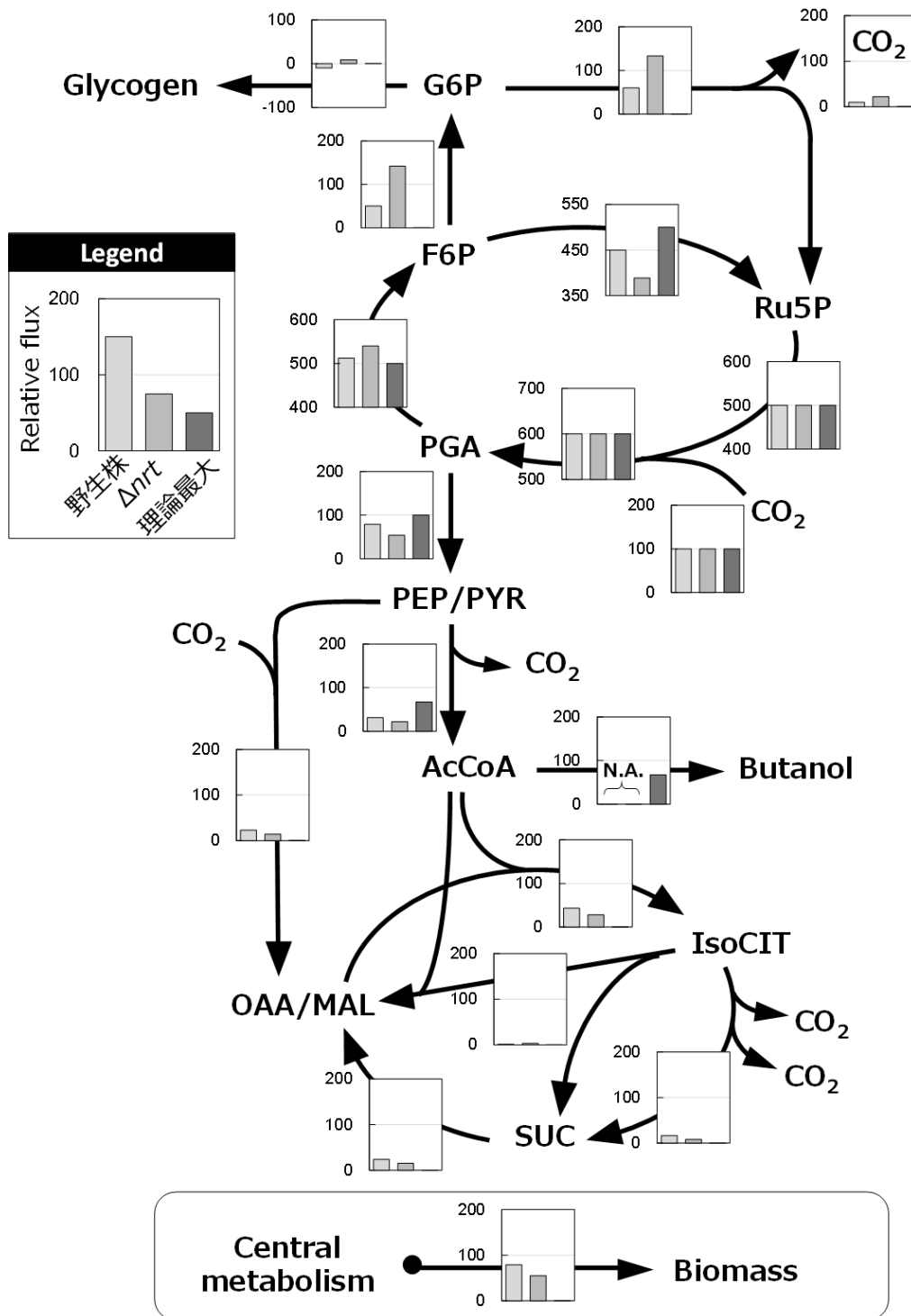


Fig. 4-23 野生株, Δnrt , および butanol 生産に理想的な代謝フラックス分布。代謝フラックスは, CO_2 取り込みを 100 として, 各経路に流れる炭素原子量を相対的に示した。窒素制限によってバイオマス合成フラックスが低下し, 中央代謝系内の代謝フラックス分布が変化したことが分かる。なお, *Synechocystis* 野生株および Δnrt は butanol 合成経路を持っていない。

また、本章で解析した Δnrt は物質生産に有用な形質を備えている。一般的に用いられる窒素枯渇条件は、窒素を含む培地で培養した菌体を回収し、窒素を含まない培地に植え継ぐというものである。窒素枯渇条件では細胞は生理活動を停止するため、長期間の培養には窒素源の逐次添加などの工夫が必要となる (Carrieri *et al.*, 2012 ; Takagi *et al.*, 2000)。一方 Δnrt は硝酸イオンを培地中から拡散で取り込むと考えられ、細胞は休止状態に移行せず、安定な窒素制限状態を保つことができる。本研究ではバイオリアクターを用いて、少なくとも 100 h 程度 Δnrt が指数増殖を維持できることを確認した。また Δnrt の特徴として、培地中の硝酸イオン濃度によって、細胞の窒素制限の程度を調整できることや、アンモニウムイオンを用いて培養することで野生株と同等の増殖を達成できることを確認している。そこで、 Δnrt を用いた物質生産系は、アンモニウムイオンを用いた菌体増殖期と、硝酸イオンを用いた安定した長期の窒素制限状態における物質生産期の2段階培養を行う理想的な系であると考えられる。

4-4 結言

細胞による物質生産をバイオマス合成と競合させず、目的物質の生産収率を高めるには、窒素などの栄養源を制限した条件での培養が有効である。シアノバクテリアは窒素制限条件下で炭素代謝を変化させることが知られていたが、炭素フローがどのように変化するかは明らかにされていなかった。本章では、代謝フラックス解析により、窒素制限条件下における *Synechocystis* 細胞の代謝フラックス分布を初めて明らかにした。

代謝フラックス解析を適用できる窒素制限系として、硝酸トランスポータ (Nrt) 破壊株 (Δnrt) を作成した。構築した Δnrt は硝酸トランスポータの欠損により、増殖速度の低下や、phycobilisome の分解による退色、glycogen を蓄積するという、一般的に窒素枯渇条件下で知られる応答を見せることを確認した。また Δnrt の増殖速度は培地の硝酸濃度に依存したことから、拡散により硝酸イオンを取り込むことが示唆された。以上により、窒素源が微量ずつ細胞内に供給される、代謝フラックス解析が適用可能な窒素制限条件を構築できたと判断した。

野生株と Δnrt を 25 mM の硝酸濃度において培養し、代謝フラックス解析した結果、 Δnrt では比増殖速度が野生株の 1/5 に減少したが、RuBisCO による CO₂ 固定反応の代謝フラックスの低下は野生株に比べて約 1/3 であった。 Δnrt では固定した炭素のバイオマス合成への利用効率が低下したことが分かった。 Δnrt では解糖系下流や TCA サイクルの代謝フラックスが野生株と比較して小さくなり、glycogen 合成経路や OPP 経路の代謝フラックスは大きくなった。glycogen 合成および OPP 経路における CO₂ 排出が炭素の利用効率を低下させたと考えられる。物質生産においては、目的物質の合成経路を細胞に導入し、glycogen 合成経路や OPP 経路の代謝フラックスを小さくするように代謝を改変することが必要であると考えられる。

本研究で用いた Δnrt による窒素制限条件は一般的に用いられる窒素枯渇条件とは厳密に異なる。しかし、窒素枯渇時に見られる glycogen 蓄積、退色現象、増殖低下、アンテナ色素の分解などが観察され、少なからず関連があると考えられる。本研究では代謝フラックス解析が適用可能な系として Δnrt の解析を行ったが、今後のシアノバクテリアの窒素制限に関する研究の進展に向けた一歩となると考えている。

さらに、本章で構築した Δnrt は、アンモニウムイオンを用いた菌体増殖期と、硝酸イオンを用いた安定した長期の窒素制限という 2 段階培養を行うことが可能である。このことから Δnrt は物質生産のプラットフォームとして使用できる可能性を持っている。

5章 結論

5-1 結果のまとめ

シアノバクテリアを用いた、光合成により CO_2 から有用物質を生産するプロセスの実用化が期待されている。シアノバクテリアは CO_2 からの直接有用物質生産が可能な点、潜在的な効率が高い点、スケールアップが容易である点など、多くの長所を有している。一方で、その生産性はいまだに低く、生産速度だけでなく生産収率も大きな向上の余地を残している。収率向上のために、細胞が固定した CO_2 をより効率的に目的物質に変換するには、細胞内の代謝状態を最適化する必要があった。培養環境に応じて細胞が代謝をどのように変化させるのかを把握し、適切な制御や改変を加えなければならない。そこで本研究では、モデル生物である *Synechocystis* sp. PCC 6803 について異なる栄養条件下において代謝フラックス分布を明らかにすることを目的とした。シアノバクテリアに適用できる代謝フラックス解析法として、 ^{13}C 標識 glucose を用いた手法と、 ^{13}C 標識 CO_2 を用いた手法の開発を行った。さらに解析結果から、代謝制御メカニズムの推定や、物質生産に向けてどのような代謝改変戦略が有効かを明らかにすることを目指した。

第2章では、 ^{13}C 標識 glucose を用いる代謝フラックス解析法を開発し、混合栄養条件と従属栄養条件の *Synechocystis* の代謝フラックス分布の違いを明らかにした。代謝フラックスの推定精度を考慮した評価によって、中央代謝系内の半分以上の反応において2条件間で有意な差を見出すことができた。物質生産には、 CO_2 排出を伴う OPP 経路の炭素フローを小さくするように代謝を改変することが有効だと考察した。さらに、代謝フラックス解析結果と、メタボローム分析およびトランスクリプトーム分析結果との比較を行い、細胞内の各オーム階層におけるデータの対応関係に着目し、代謝変化の原因を推定した。その結果、多くの代謝反応のフラックスに大きな変化が見られたのに対して、それに対応する酵素遺伝子の発現量や、代謝物質プール量の変化は小さいことが分かった。*Synechocystis* 細胞は解析した2条件間において、一部の遺伝子発現量を調節することで炭素フローを大きく変化させたことが示唆された。

第3章では、 ^{13}C 標識 CO_2 を用いた同位体的非定常状態における代謝フラックス解析法を構築し、光独立栄養条件における *Synechocystis* の代謝フラックス分布を解析した。光独立栄養条件で代謝フラックスを解析するには同位体的非定常状態における解析法が必須だが、これまでに構築されていなかった。そこで本研究では同位体非定常な解析系として、培養中に ^{13}C 標識炭酸水を添加することで細胞に ^{13}C 標識 CO_2 を取り込ませ、細胞内代謝物質が ^{13}C 標識されていく過程から代謝フラックスを求める手法を構築した。代謝フラックス解析の結果、光独立栄養条件では CO_2 固定を行うカルビンサイクル

の代謝フラックスが大きく、従属栄養条件や混合栄養条件において代謝フローが存在した OPP 経路の代謝フラックスは非常に小さいことが明らかになった。さらに、 ^{13}C 標識実験において捉えた ^{13}C 標識パターンのダイナミクスから代謝反応のキネティクスについて考察し、代謝反応の律速点を部分的に絞り込むことができた。観察解析結果を踏まえ、光合成による CO_2 からの有用物質生産に有効な代謝改変戦略を考察した結果、 CO_2 を排出する経路や菌体構成成分の生成経路の代謝フラックスを低下させること、カルビンサイクルからの炭素フローの分岐点および分岐比が重要であることがわかった。

第4章では、代謝フラックス解析により、窒素制限条件における *Synechocystis* の代謝フラックス分布を初めて明らかにした。窒素制限条件は、菌体合成を阻害し目的物質の収率を高める目的で物質生産に用いられる培養条件である。先行研究では *glycogen* の蓄積や代謝物質プール量の変化が確認されていたが、炭素フローの変化は明らかにされていなかった。本研究では ^{13}C 標識実験が適用可能な、硝酸トランスポータ破壊株 (Δnrt) を用いた窒素制限条件を構築し、野生株との代謝フラックス分布の差を明らかにした。 Δnrt では RuBisCO による CO_2 固定反応の代謝フラックスは野生株に比べて約 1/3 に低下したが、炭素のロスが増大したことで比増殖速度は野生株の 1/5 まで減少した。 Δnrt では解糖系下流や TCA サイクルの代謝フラックスは小さくなり、*glycogen* 生産経路や OPP 経路の代謝フラックスが大きくなった。窒素制限下において、バイオマス合成速度の低下に対して相対的に CO_2 取り込みフラックスが大きくなったため、余剰の炭素を *glycogen* 生産や OPP 経路で CO_2 として排出したと考えられる。窒素制限下での物質生産には、*glycogen* や OPP 経路の炭素フローを小さくし、目的物質生産経路に炭素フローを向けることが有効と考えられる。

5-2 シアノバクテリアの¹³C代謝フラックス解析

シアノバクテリアの¹³C代謝フラックス解析に対して本研究がもたらす寄与と、今後の展望を述べる。

第2章では¹³C標識 glucose を用いる同位体的定常状態における解析手法を開発した。この手法は、大腸菌などの従属栄養微生物で一般的に使用される手法である。シアノバクテリアについても実施例が数例存在するが (Yang *et al.*, 2002 ; You *et al.*, 2014), 本研究では glucose の¹³C標識パターンの検討や、代謝モデル中の一部の経路の検証、代謝フラックスの推定精度の評価などを加えた。

glucose の¹³C標識パターンは代謝フラックス解析精度に影響を与えるため、注目する OPP 経路の代謝フラックス推定精度を高めるように事前にシミュレーションによる検討を行った。その結果得られた $[1-^{13}\text{C}]\text{glucose} : [\text{U-}^{13}\text{C}]\text{glucose} = 0.7 : 0.3$ の比率の¹³C標識 glucose を用いることで、OPP 経路を含む多くの経路について2条件間で代謝フラックスの有意な差を捉えることができた。しかし本研究で使用した¹³C標識パターンではペントースリン酸経路の一部や、補充経路周辺は推定精度が悪く、今後行われる代謝フラックス解析でこれら経路に注目する場合は、推定精度を高めるために¹³C標識基質の検討を重ねる必要がある。また *Synechocystis* の中央代謝に存在が不明確な経路が存在したため、それらを含めた代謝モデルを用いて代謝フラックスの算出を行った。結果としては glucose を資化する2条件ではグリオキシル酸経路および TCA バイパス経路が機能していることは示されなかった。さらに、代謝フラックスの推定精度を評価するために、代謝フラックス値の変化に対するフィッティングにおける残差の感度を解析する手法を導入した。シアノバクテリアの¹³C標識 glucose を用いた代謝フラックス解析に対してこの手法が用いられたのは本研究が初めてであり、推定精度を考慮した上で統計的に代謝フラックスの差の議論を可能とした。

第3章では、¹³C標識 CO₂を用いた同位体的非定常状態における代謝フラックス解析系を新しく構築し、第4章ではそれをさらに改良して用いた。本手法によって光独立栄養条件下における代謝フラックスを解析可能なため、シアノバクテリアの物質生産収率向上に求められる技術であった。この手法の難しさは、代謝状態を安定に保ちながら細胞に¹³Cを摂取させる¹³C標識実験系の構築と、代謝物質の¹³C標識パターンの推移を捉える測定手法である。本研究ではこれらを実施できる系をそれぞれ構築して、代謝フラックスを算出可能にした。なお同等の手法を用いて Young からも *Synechocystis* の光独立栄養条件下での代謝フラックス解析を報告している (Young *et al.*, 2011)。開発した¹³C標識 CO₂を用いた代謝フラックス解析法によって、さらに多くの培養環境や、遺伝子欠損株について解析を行うことで、今後シアノバクテリアの代謝制御メカニズムをより詳細に理解できるだろう。しかし、一方で本代謝フラックス解析の適用範囲も存在する。

^{13}C 標識炭酸水の添加によって細胞の代謝状態を変化させてはならないため、適用対象は高炭酸状態に限られ、炭酸濃度の低い環境で代謝フラックスを解析するには適さない。そのため培地に CO_2 通気を行う、あるいは炭酸を添加するなどして高炭酸濃度に維持する必要がある。

本研究では光独立栄養条件において代謝フラックスを推定するために、培養途中で ^{13}C を添加し、細胞内代謝物質の ^{13}C 標識パターンの変化を測定した。培養系内の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比の切り替えは一度きりのイベントであり、 ^{13}C 標識パターンのダイナミクスを測定することが難しかった。さらに代謝フラックス推定の信頼性を高める手法として、 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ のリミットサイクル系を使用する手法が提案できる。 ^{12}C および ^{13}C をそれぞれ正弦波で連続的に添加することで、系内の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ が安定した振幅で振動するリミットサイクルを形成させられる。これによって、一度だけであった代謝物質の ^{13}C 標識パターン変化を周期的に生じさせることができ、 ^{13}C 標識パターン変化の測定の信頼性を高められると考えられる。このような系を実現するには、培養上の工夫が必要になる。炭酸を添加し続けるため、炭酸濃度を一定に保つ工夫や、サンプリングによる培養液の減少を補充するため連続培養系が必要である点などである。以上の培養上の改良を加え ^{13}C 標識実験系を構築できれば、代謝フラックス推定の信頼性を高められるだろう。

また本研究の第2章では、代謝フラックス解析結果をメタボロームデータ、トランスクリプトームデータといった異なる階層のオームデータと統合することで、従属栄養条件と混合栄養条件の代謝変化のメカニズムを推定した。その結果、代謝反応のフラックスの変化は必ずしも対応する酵素遺伝子の発現量によって制御されていないことが分かった。ここで見られた炭素フローの再編成は各代謝経路の酵素遺伝子の発現量変化ではなく、1 遺伝子の発現量変化が起点となり生じたことが示唆された。すなわち、しばしば細胞の代謝状態を調査するためにトランスクリプトーム解析やメタボローム解析が用いられるが、それらから代謝フラックスを推定することは困難な場合がある。代謝のフローを正確に捉えるには ^{13}C 代謝フラックス解析の実施が必須であることが示された。また逆に、代謝フラックスのみを明らかにしても代謝変動のメカニズムを推定することが困難な場合があるとも言える。代謝制御メカニズムを明らかにするには、複数のオーム階層のデータを縦断的に解析する方法が有効だと考えられる。

5-3 代謝フラックスに着目したシアノバクテリアの育種

本研究で解析した各栄養条件の代謝フラックス解析結果がもたらす新たな知見と、その育種の戦略立案への貢献の可能性、および今後の展望を述べる。

従属栄養条件や混合栄養条件については、 ^{13}C 標識 glucose を用いた代謝フラックス解析が行われている (Yang *et al.*, 2002 ; You *et al.*, 2014). Yang らは *Synechocystis* を用いて混合栄養条件と、暗所での培養による従属栄養条件の代謝フラックスを解析した (Yang *et al.*, 2002). Yang らの研究で用いられた混合栄養条件では培養液中に炭酸が含まれていないとして、You らグループによっても近年 *Synechocystis* の炭素源が十分な混合栄養条件での解析が行われた (You *et al.*, 2014). 本研究における混合栄養条件の代謝フラックス解析結果をこれらの結果と比較すると、全ての結果で glucose と CO_2 の同時取り込みが観察されている。その取り込みフラックスの比率は各研究において異なるが、培養条件中の炭酸の利用可能度によって変化するためと考えられる。また先行 2 研究ではほとんど見られなかった OPP 経路の炭素フローが本研究では確認された。OPP 経路は補酵素 NADPH を生産する代謝経路であり、光合成電子伝達系における NADPH 生産量に影響を受けると考えられる。Yang らの暗所で培養した従属栄養条件、本研究における atrazine による光合成阻害を用いた従属栄養条件でも OPP 経路の代謝フラックスは大きく増加した。OPP 経路は CO_2 の排出を伴うため、炭素の利用効率を高めるには菌体あたりの照射光量を増大させることが効果的と考えられる。

さらに、glucose を資化する条件でも CO_2 取り込み速度を向上する余地があることを以下で述べる。本研究で解析した混合栄養条件における比増殖速度は 0.105 1/h であり、このとき RuBisCO による CO_2 固定フラックスは 1.8 mmol/gDCW/h であった。一方、第 3 章で解析した光独立利用条件では比増殖速度が 0.091 1/h、RuBisCO の代謝フラックスは 5.2 mmol/gDCW/h であった。つまり CO_2 固定フラックスは少なくとも 5.2 mmol/gDCW/h まで到達可能であり、混合栄養条件下では CO_2 の取り込み反応は潜在的に向上する余地を残している。本研究で解析した混合栄養条件では培地に炭酸塩や CO_2 ガスの供給を行っていないため、 CO_2 固定フラックスが十分大きくはなかった可能性が高い。混合栄養条件において、glucose の取り込み速度が変わらないまま (0.53 mmol/gDCW/h)、RuBisCO フラックスを 5.2 mmol/gDCW/h まで高めることができれば、0.18 1/h 程度まで比増殖速度を高められる。これは倍化時間にすると 4 h を下回る増殖の速さであり、光独立栄養では倍化時間が 7-10h とされる *Synechocystis* の増殖速度 (Yu *et al.*, 2013) を大きく飛躍させられる可能性を示している。

第 3 章で解析した光独立栄養条件の代謝フラックス解析結果より、本条件では OPP 経路による CO_2 のロスは観察されなかったが、TCA サイクルの炭素フローやバイオマス成分の合成によって炭素を大きく失うことが分かった。そこで光独立栄養条件ではこ

これらの経路の代謝フラックスを低減することで目的物質の生産収率を向上する必要がある。さらに、カルビンサイクルで固定した炭素の多くは **PGA** を分岐点として解糖系下流へ向かうことが分かった。シアノバクテリアでこれまでに実験的に生産が試みられている有用化合物は **PGA** から解糖系方向に反応が進んで生産される **PYR**, **AcCoA** を前駆体とするものが多い。**PYR** や **AcCoA** などを前駆体とする化合物の生産は、光独立栄養条件において大きな代謝変動を伴わず、代謝改変の規模を小さくすることができると考えられる。

第4章の窒素制限下における代謝フラックス解析結果からは、窒素制限による菌体合成の阻害により生じた余剰の炭素は **glycogen** の生産に使用されるほか、**OPP** 経路で CO_2 として排出されることが推定された。窒素制限条件では、**F6P** を分岐点としてカルビンサイクルから **G6P** 方向へ炭素が流出するフローが大きくなることから、**glycogen** や **sucrose** を目的物質とする物質生産の場合は生産収率の向上が比較的容易と推測される。その他の物質の生産を行うには、それぞれ前駆体物質を合成するフローを大きくする必要がある。例えば **PYR** や **AcCoA** を前駆体とする物質の生産には、**PGA** においてカルビンサイクルから炭素フローを分岐させるような改変が必要となるだろう。また、菌体増殖の低下の程度ほど CO_2 固定速度は低下せず、ある程度の炭素が **PGA** から解糖系下流に流れていることも明らかになった。代謝フラックス分布を大きく変えられない場合でも、菌体濃度を高くした高密度培養を行うことで絶対的な目的物質の生産速度を高めることが可能だと考えられる。

さらに第2章から得られた知見を応用すると、細胞の代謝フラックス分布を改変する場合には必ずしも個々の代謝反応をコントロールする必要がない。本研究で示唆されたバルブのように代謝状態を切り替える代謝調節機構を用いれば、細胞に施す改変を小さくすることができるだろう。このような細胞が持つ代謝調節機構に関する知見は今後集積されるべきであり、同時に細胞内に遺伝子回路を構築し代謝状態を切り替える研究 (Soma *et al.*, 2014) を行うことも重要と考えられる。

本研究では、**glucose** あるいは CO_2 を炭素源とする複数の異なる栄養条件に注目した。その結果、カルビンサイクルや **OPP** 経路を含む中央代謝上流の代謝フラックス分布が、栄養条件間で大きく異なることが分かった (Fig. 5-1 A, B)。この代謝経路には、**glucose** と CO_2 の取り込み、**OPP** 経路による CO_2 の排出が関わっており、炭素のバランスの観点から物質生産収率を向上に重要である。各栄養条件において炭素を有効利用するためには、本研究で測定された Fig. 5-1 B の代謝フローを Fig. 5-1 C の示す状態に移行させることが望ましい。そこで、 CO_2 排出を伴う **OPP** 経路を削除する戦略が全ての栄養条件において有効と思われる。また、光独立栄養条件や窒素制限条件で収率を高めるには、**glycogen** 合成に炭素を使用しないために、**glycogen** 合成経路あるいは **Pgi** 反応の破壊が有効と考えられる。このように、各栄養条件で中央代謝系内の、特にペントー

スリン酸経路周辺を最適化することが代謝改変において重要であろう。

以上の議論は炭素収支のみに注目しており, NADPH や ATP などの補酵素については考慮していない. 例えば従属栄養条件であっても, 目的物質の生産経路に NADPH が必要な場合は, OPP 経路の代謝フラックスを大きくする, または光の照射を行い混合栄養条件に移行させるなどの対応が必要になるだろう. さらに, 自然光で培養を行う際には昼夜サイクルを考慮する必要があるが, 連続光のプロセスを考える場合は, 常に光独立栄養条件での生産が可能になるため, 有効な戦略は変化する. 目的のプロセスに応じて, 適切に代謝をデザインすることが必要である.

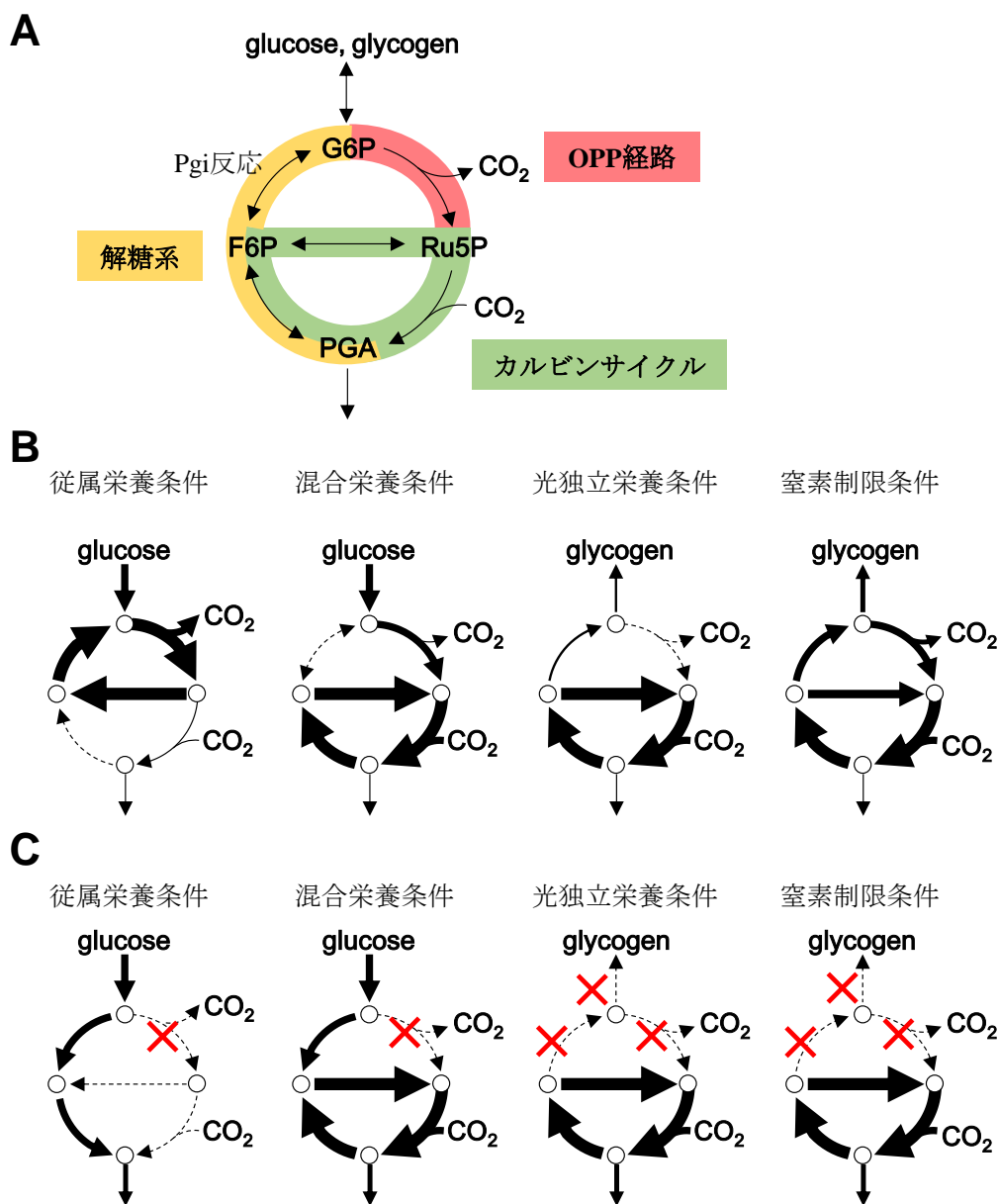


Fig. 5-1 栄養条件間で大きな代謝フラックス変化が見られた代謝経路.

(A) 代謝経路の説明, (B) 測定した各条件での代謝フロー, (C) 収率を高める改変.

近年、計算機シミュレーションによって、微生物の物質生産性を高める代謝状態を設計する試みが盛んになっている。例えば広く使用されるフラックスバランス解析という手法は、化学量論に基づいて代謝経路をモデル化することで、細胞が増殖を最大化するときの代謝フラックス分布、あるいは目的物質を最大収率で生産する際の代謝フラックス分布などを算出できる (Orth *et al.*, 2010)。このような計算機シミュレーションツールによって、遺伝子破壊や培養環境の変化によって目的物質の生産性がどのように変化するかを調べ、最適な代謝改変方法を明らかにできる。大腸菌やコリネ型細菌といった物質生産に使用される従属栄養微生物では、計算機シミュレーションによる設計に基づいた育種が実験的に検証されている (Alper *et al.*, 2005 ; Becker *et al.*, 2011)。代謝シミュレーションが微生物育種の設計図を得る試みとすれば、本研究で行った代謝フラックス解析は、実際の細胞の状態を把握する“診断技術”に相当する。代謝シミュレーションによる設計に基づいて代謝改変を行っても、予測通りの生産性を達成することは多くない。代謝シミュレーションが微生物の代謝制御の複雑さを反映していない、あるいは意図的に無視しているためである。代謝フラックス解析によって細胞の代謝フラックス分布を実験的に明らかにすることで、設計との解離を定量的に明らかにすることができる (Fig. 5-2)。代謝フラックスの差を設計に近づけるための更なる改変戦略を見出しやすくなると考えられる (Lee *et al.*, 2005)。

Synechocystis を含むシアノバクテリアについても、計算機による代謝シミュレーションツールが報告されている (Knoop *et al.*, 2010; Nogales *et al.*, 2012; Yoshikawa *et al.*, 2011)。さらに、Vu らはシアノバクテリアによる様々な物質生産において、生産性を向上させる遺伝子破壊を示した (Vu *et al.*, 2014)。一方でシアノバクテリアに対して計算機シミュレーションに基づく代謝改変を実践した例はこれまで報告されていない。今後は、物質生産性の向上を効率化するために、このような計算機予測に基づく戦略的育種法がますます取られるようになると考えられる。本研究で開発したシアノバクテリアの ^{13}C 代謝フラックス解析法は、育種上の課題点を抽出するために重要な役割を果たすと期待される。

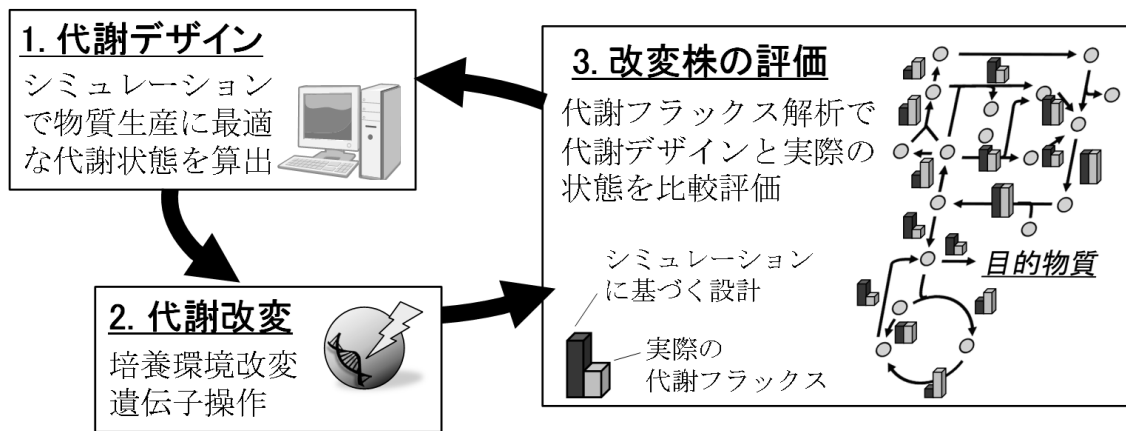


Fig. 5-2 計算機に基づく代謝デザインと代謝フラックス解析を用いる育種法.
シミュレーションによる最適な代謝フラックス分布と、実際の状態を比較すること
で、代謝改変戦略を明確にすることができる.

参考文献

Aguirre von Wobeser E, Ibelings BW, Bok J, Krasikov V, Huisman J, Matthijs HC. Concerted changes in gene expression and cell physiology of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 during transitions between nitrogen and light-limited growth. *Plant Physiol.* 2011;155(3):1445-57.

Aikawa S, Nishida A, Ho SH, Chang JS, Hasunuma T, Kondo A. Glycogen production for biofuels by the euryhaline cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 from an oceanic environment. *Biotechnol Biofuels.* 2014;7:88.

Allen MM. Cyanobacterial cell inclusions. *Annu Rev Microbiol.* 1984;38:1-25.

Alper H, Jin YS, Moxley JF, Stephanopoulos G. Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2005;7(3):155-64.

Angermayr SA, van der Woude AD, Correddu D, Vreugdenhil A, Verrone V, Hellingwerf KJ. Exploring metabolic engineering design principles for the photosynthetic production of lactic acid by *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnol Biofuels.* 2014;7:99.

Antoniewicz MR, Kelleher JK, Stephanopoulos G. Determination of confidence intervals of metabolic fluxes estimated from stable isotope measurements. *Metab Eng.* 2006;8(4):324-37.

Antoniewicz MR, Kelleher JK, Stephanopoulos G. Elementary metabolite units (EMU): a novel framework for modeling isotopic distributions. *Metab Eng.* 2007;9(1):68-86.

Atsumi S, Higashide W, Liao JC. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat Biotechnol.* 2009;27(12):1177-80.

Azuma M, Osanai T, Hirai MY, Tanaka K. A response regulator Rre37 and an RNA polymerase sigma factor SigE represent two parallel pathways to activate sugar catabolism in a cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 2011;52(2):404-12.

Becker J, Zelder O, Häfner S, Schröder H, Wittmann C. From zero to hero--design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metab Eng.* 2011;13(2):159-68.

Bogorad IW, Lin TS, Liao JC. Synthetic non-oxidative glycolysis enables complete carbon conservation. *Nature*. 2013;502(7473):693-7.

Bumbak F, Cook S, Zachleder V, Hauser S, Kovar K. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;91(1):31-46.

Carrieri D, Paddock T, Maness PC, Seibert M, Yu J. Photo-catalytic conversion of carbon dioxide to organic acids by a recombinant cyanobacterium incapable of glycogen storage. *Energy Environ Sci*. 2012;5:9457-61.

Davies FK, Work VH, Beliaev AS, Posewitz MC. Engineering limonene and bisabolene production in wild type and a glycogen-deficient mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Front Bioeng Biotechnol*. 2014;2:21.

Ducat DC, Way JC, Silver PA. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol*. 2011;29(2):95-103.

Ducat DC, Avelar-Rivas JA, Way JC, Silver PA. Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(8):2660-8.

Feng X, Page L, Rubens J, Chircus L, Colletti P, Pakrasi HB, Tang YJ. Bridging the gap between fluxomics and industrial biotechnology. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:460717.

Forchhammer K. Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiol Rev*. 2004;28(3):319-33.

Gao Z, Zhao H, Li X, Tan X, Lu X. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. *Energy Environ Sci*. 2012;5:9857-65.

Gudmundsson S, Nogales J. Cyanobacteria as photosynthetic biocatalysts: a systems biology perspective. *Mol Biosyst*. 2015;11(1):60-70.

Görl M, Sauer J, Baier T, Forchhammer K. Nitrogen-starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: adaptation to long-term survival. *Microbiology*. 1998;144:2449-58.

- Gründel M, Scheunemann R, Lockau W, Zilliges Y. Impaired glycogen synthesis causes metabolic overflow reactions and affects stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*. 2012;158:3032-43.
- Guerrero F, Carbonell V, Cossu M, Correddu D, Jones PR. Ethylene synthesis and regulated expression of recombinant protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One*. 2012;7(11):e50470.
- Hasunuma T, Kikuyama F, Matsuda M, Aikawa S, Izumi Y, Kondo A. Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion. *J Exp Bot*. 2013;64(10):2943-54.
- Hickman JW, Kotovic KM, Miller C, Warrenner P, Kaiser B, Jurista T, Budde M, Cross F, Roberts JM, Carleton M. Glycogen synthesis is a required component of the nitrogen stress response in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Algal Res*. 2013;2(2):98-106.
- Jansén T, Kurian D, Raksajit W, York S, Summers ML, Mäenpää P. Characterization of trophic changes and a functional oxidative pentose phosphate pathway in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Acta Physiol Plant*. 2010;32:511-18.
- Jiang L, Luo S, Fan X, Yang Z, Guo R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. *Appl Energ*. 2011;88(10):3336-41
- Jiang Y, Yoshida T, Quigg A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. *Plant Physiol Biochem*. 2012;54:70-7.
- Jordà J, Suarez C, Carnicer M, ten Pierick A, Heijnen JJ, van Gulik W, Ferrer P, Albiol J, Wahl A. Glucose-methanol co-utilization in *Pichia pastoris* studied by metabolomics and instationary ¹³C flux analysis. *BMC Syst Biol*. 2013;7:17.
- Joseph A, Aikawa S, Sasaki K, Teramura H, Hasunuma T, Matsuda F, Osanai T, Hirai MY, Kondo A. Rre37 stimulates accumulation of 2-oxoglutarate and glycogen under nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett*. 2014;588(3):466-71.
- Kajihata S, Furusawa C, Matsuda F, Shimizu H. OpenMebius: an open source software for

isotopically nonstationary ^{13}C -based metabolic flux analysis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:627014.

Kim HW, Vannela R, Zhou C, Harto C, Rittmann BE. Photoautotrophic nutrient utilization and limitation during semi-continuous growth of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnol Bioeng*. 2010;106(4):553-63.

Knoop H, Gründel M, Zilliges Y, Lehmann R, Hoffmann S, Lockau W, Steuer R. Flux balance analysis of cyanobacterial metabolism: the metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(6):e1003081.

Knoop H, Zilliges Y, Lockau W, Steuer R. The metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803: systemic properties of autotrophic growth. *Plant Physiol*. 2010;154(1):410-22.

Kochanowski K, Volkmer B, Gerosa L, Haverkorn van Rijsewijk BR, Schmidt A, Heinemann M. Functioning of a metabolic flux sensor in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(3):1130-5.

Krasikov V, Aguirre von Wobeser E, Dekker HL, Huisman J, Matthijs HC. Time-series resolution of gradual nitrogen starvation and its impact on photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Physiol Plant*. 2012 ;145(3):426-39.

Kurian D, Jansèn T, Mäenpää P. Proteomic analysis of heterotrophy in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics*. 2006;6(5):1483-94.

Kusakabe T, Tatsuke T, Tsuruno K, Hirokawa Y, Atsumi S, Liao JC, Hanai T. Engineering a synthetic pathway in cyanobacteria for isopropanol production directly from carbon dioxide and light. *Metab Eng*. 2013;20:101-8.

Lan EI, Liao JC. ATP drives direct photosynthetic production of 1-butanol in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(16):6018-23.

Lee SY, Lee DY, Kim TY. Systems biotechnology for strain improvement. *Trends Biotechnol*. 2005;23(7):349-58.

Leighty RW, Antoniewicz MR. Parallel labeling experiments with $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose validate *E. coli* metabolic network model for ^{13}C metabolic flux analysis. *Metab Eng*. 2012;14(5):533-41.

- Lindberg P, Park S, Melis A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab Eng.* 2010;12(1):70-9.
- Mawhinney TP, Robinett RS, Atalay A, Madson MA. Analysis of amino acids as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr.* 1986;358(1):231-42.
- Melis A. Carbon partitioning in photosynthesis. *Curr Opin Chem Biol.* 2013;17(3):453-6.
- Moreland DE. Mechanisms of action of herbicides. *Annu Rev Plant Physiol.* 1980;31:597–638.
- Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ. The NADP⁺-isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) is nitrogen regulated in cyanobacteria. *J Bacteriol.* 1996;178(14):4070-6.
- Nogales J, Gudmundsson S, Knight EM, Palsson BO, Thiele I. Detailing the optimality of photosynthesis in cyanobacteria through systems biology analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(7):2678-83.
- Octave S, Thomas D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie.* 2009;91(6):659-64.
- Ohashi Y, Shi W, Takatani N, Aichi M, Maeda S, Watanabe S, Yoshikawa H, Omata T. Regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria. *J Exp Bot.* 2011;62(4):1411-24.
- Oliver JW, Atsumi S. Metabolic design for cyanobacterial chemical synthesis. *Photosynth Res.* 2014;120(3):249-61.
- Omata T, Ohmori M, Arai N, Ogawa T. Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 defective in nitrate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(17):6612-6.
- Orth JD, Thiele I, Palsson BØ. What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol.* 2010;28(3):245-8.
- Osanai T, Imamura S, Asayama M, Shirai M, Suzuki I, Murata N, Tanaka K. Nitrogen induction of sugar catabolic gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* 2006;13(5):185-95.

Osanai T, Oikawa A, Shirai T, Kuwahara A, Iijima H, Tanaka K, Ikeuchi M, Kondo A, Saito K, Hirai MY. Capillary electrophoresis-mass spectrometry reveals the distribution of carbon metabolites during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Environ Microbiol.* 2014;16(2):512-24.

Pearce J, Leach CK, Carr NG. The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *J Gen Microbiol.* 1969;55(3):371-8.

Pinto F, Pacheco CC, Ferreira D, Moradas-Ferreira P, Tamagnini P. Selection of suitable reference genes for RT-qPCR analyses in cyanobacteria. *PLoS One.* 2012;7(4):e34983.

Poli R, James K, Tim B. Particle swarm optimization. *Swarm intelligence.* 2007;1(1):33-57.

Satyanarayana KG, Mariano AB, Vargas JVC. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *Int J Energ Res.* 2011;35(4):291-311

Savakis PE, Angermayr SA, Hellingwerf KJ. Synthesis of 2,3-butanediol by *Synechocystis* sp. PCC6803 via heterologous expression of a catabolic pathway from lactic acid- and enterobacteria. *Metab Eng.* 2013;20:121-30.

Schmidt K, Carlsen M, Nielsen J, Villadsen J. Modeling isotopomer distributions in biochemical networks using isotopomer mapping matrices. *Biotechnol Bioeng.* 1997;55(6):831-40.

Schwarz R, Forchhammer K. Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiology.* 2005;151(8):2503-14.

Sims RE, Mabee W, Saddler JN, Taylor M. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresour Technol.* 2010;101(6):1570-80.

Sharma KK, Schuhmann H, Schenk PM. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* 2012;5(5):1532-53.

Shastri AA, Morgan JA. Flux balance analysis of photoautotrophic metabolism. *Biotechnol Prog.* 2005;21(6):1617-26.

Shi AZ, Koh LP, Tan HTW. The biofuel potential of municipal solid waste. *GCB Bioenergy*. 2009;1:317-20.

Smith AJ. Modes of cyanobacterial carbon metabolism. *Ann Microbiol*. 1983;134B(1):93-113.

Soma Y, Tsuruno K, Wada M, Yokota A, Hanai T. Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch. *Metab Eng*. 2014;23:175-84.

Stephanopoulos G, Aristidou A, Nielsen J. *Metabolic engineering*. Academic Press. 1998.

Stephanopoulos G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science*. 2007;315(5813):801-4.

Takagi M, Watanabe K, Yamaberi K, Yoshida T. Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2000;54(1):112-7.

Takahama T, Sakai S. Constrained optimization by combining the α constrained method with particle swarm optimization. In *Proc. of Joint 2nd International Conference on Soft Computing and Intelligent Systems and 5th International Symposium on Advanced Intelligent Systems*. 2004.

Takahashi H, Uchimiya H, Hihara Y. Difference in metabolite levels between photoautotrophic and photomixotrophic cultures of *Synechocystis* sp. PCC 6803 examined by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *J Exp Bot*. 2008;59(11):3009-18.

Tamoi M, Miyazaki T, Fukamizo T, Shigeoka S. The Calvin cycle in cyanobacteria is regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) ratio under light/dark conditions. *Plant J*. 2005;42(4):504-13.

Trabelsi L, Ben Ouada H, Zili F, Mazhoud N, Ammar J. Evaluation of *Arthrospira platensis* extracellular polymeric substances production in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Folia Microbiol*. 2013;58(1):39-45.

van der Woude AD, Angermayr SA, Puthan Veetil V, Osnato A, Hellingwerf KJ. Carbon sink

removal: Increased photosynthetic production of lactic acid by *Synechocystis* sp. PCC6803 in a glycogen storage mutant. *J Biotechnol.* 2014;184:100-2.

van Winden WA, van Dam JC, Ras C, Kleijn RJ, Vinke JL, van Gulik WM, Heijnen JJ. Metabolic-flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D based on mass isotopomer measurements of ¹³C-labeled primary metabolites. *FEMS Yeast Res.* 2005;5(6-7):559-68.

Varman AM, Xiao Y, Pakrasi HB, Tang YJ. Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 for isobutanol production. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(3):908-14.

Vu TT, Hill EA, Kucek LA, Konopka AE, Beliaev AS, Reed JL. Computational evaluation of *Synechococcus* sp. PCC 7002 metabolism for chemical production. *Biotechnol J.* 2013;8(5):619-30.

Wang B, Wang J, Zhang W, Meldrum DR. Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae. *Front Microbiol.* 2012;3:344.

Wiechert W. ¹³C metabolic flux analysis. *Metab Eng.* 2001;3(3):195-206.

Williams JGK. Construction of specific mutations in Photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol.* 1988;167:766-778

Wittmann C, Heinzle E. Mass spectrometry for metabolic flux analysis. *Biotechnol Bioeng.* 1999;62(6):739-750.

Xiong W, Brune D, Vermaas WF. The γ -aminobutyric acid shunt contributes to closing the tricarboxylic acid cycle in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol.* 2014;93(4):786-96.

Yang C, Hua Q, Shimizu K. Metabolic flux analysis in *Synechocystis* using isotope distribution from ¹³C-labeled glucose. *Metab Eng.* 2002;4(3):202-16.

Yoshikawa K, Kojima Y, Nakajima T, Furusawa C, Hirasawa T, Shimizu H. Reconstruction and verification of a genome-scale metabolic model for *Synechocystis* sp. PCC6803. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;92(2):347-58.

Yoshikawa K, Hirasawa T, Ogawa K, Hidaka Y, Nakajima T, Furusawa C, Shimizu H. Integrated transcriptomic and metabolomic analysis of the central metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under different trophic conditions. *Biotechnol J.* 2013;8(5):571-80.

You L, Berla B, He L, Pakrasi HB, Tang YJ. ¹³C-MFA delineates the photomixotrophic metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under light- and carbon-sufficient conditions. *Biotechnol J.* 2014;9(5):684-92.

Young JD, Shastri AA, Stephanopoulos G, Morgan JA. Mapping photoautotrophic metabolism with isotopically nonstationary ¹³C flux analysis. *Metab Eng.* 2011;13(6):656-65.

Young JD, Walther JL, Antoniewicz MR, Yoo H, Stephanopoulos G. An elementary metabolite unit (EMU) based method of isotopically nonstationary flux analysis. *Biotechnol Bioeng.* 2008;99(3):686-99.

Yu Y, You L, Liu D, Hollinshead W, Tang YJ, Zhang F. Development of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Mar Drugs.* 2013;11(8):2894-916.

Zamboni N, Fendt SM, Rühl M, Sauer U. ¹³C-based metabolic flux analysis. *Nat Protoc.* 2009;4(6):878-92.

Zhang S, Bryant DA. The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science.* 2011 ;334(6062):1551-3.

付録

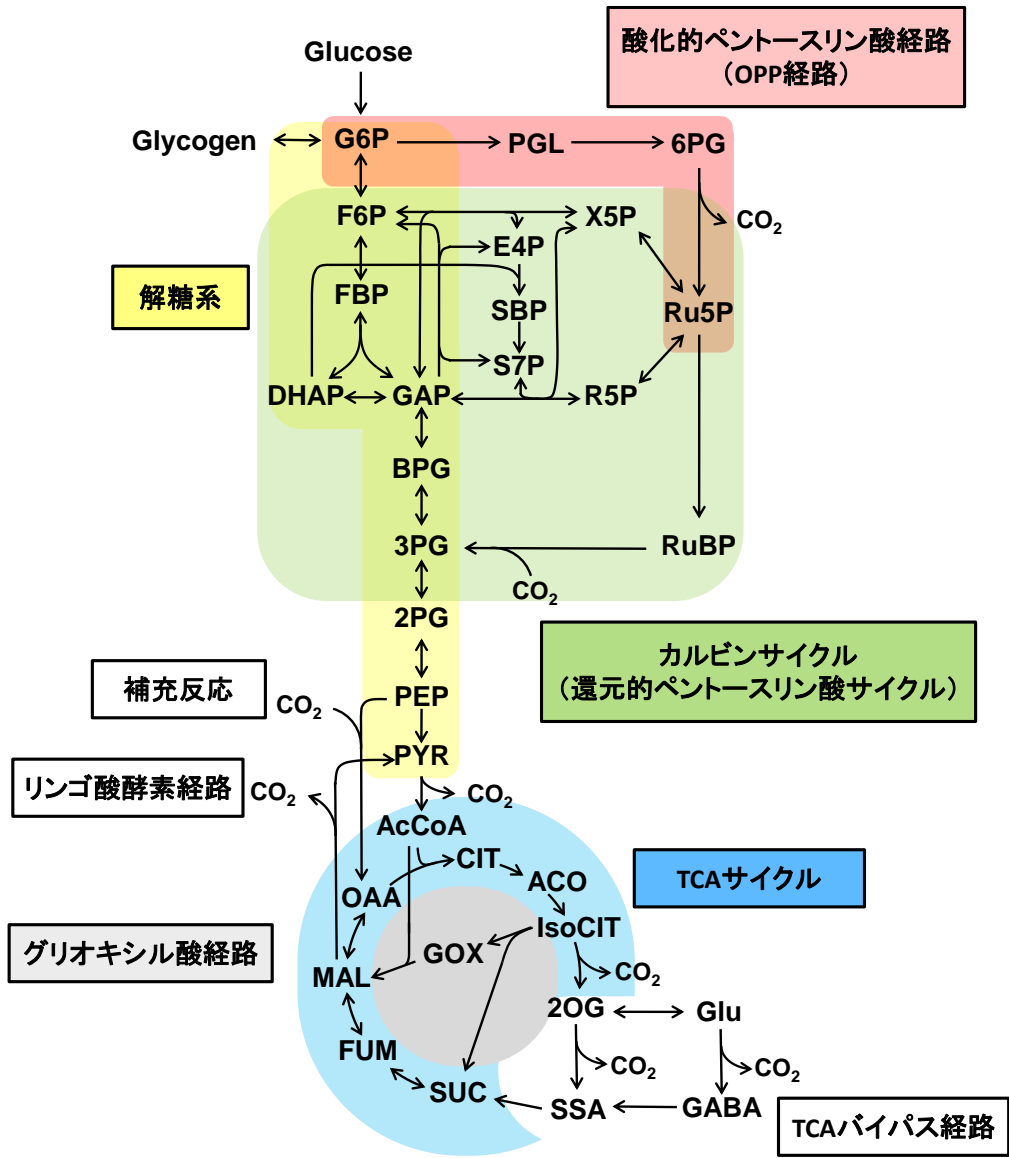


Fig. S-1 *Synechocystis* の中央代謝経路の概要

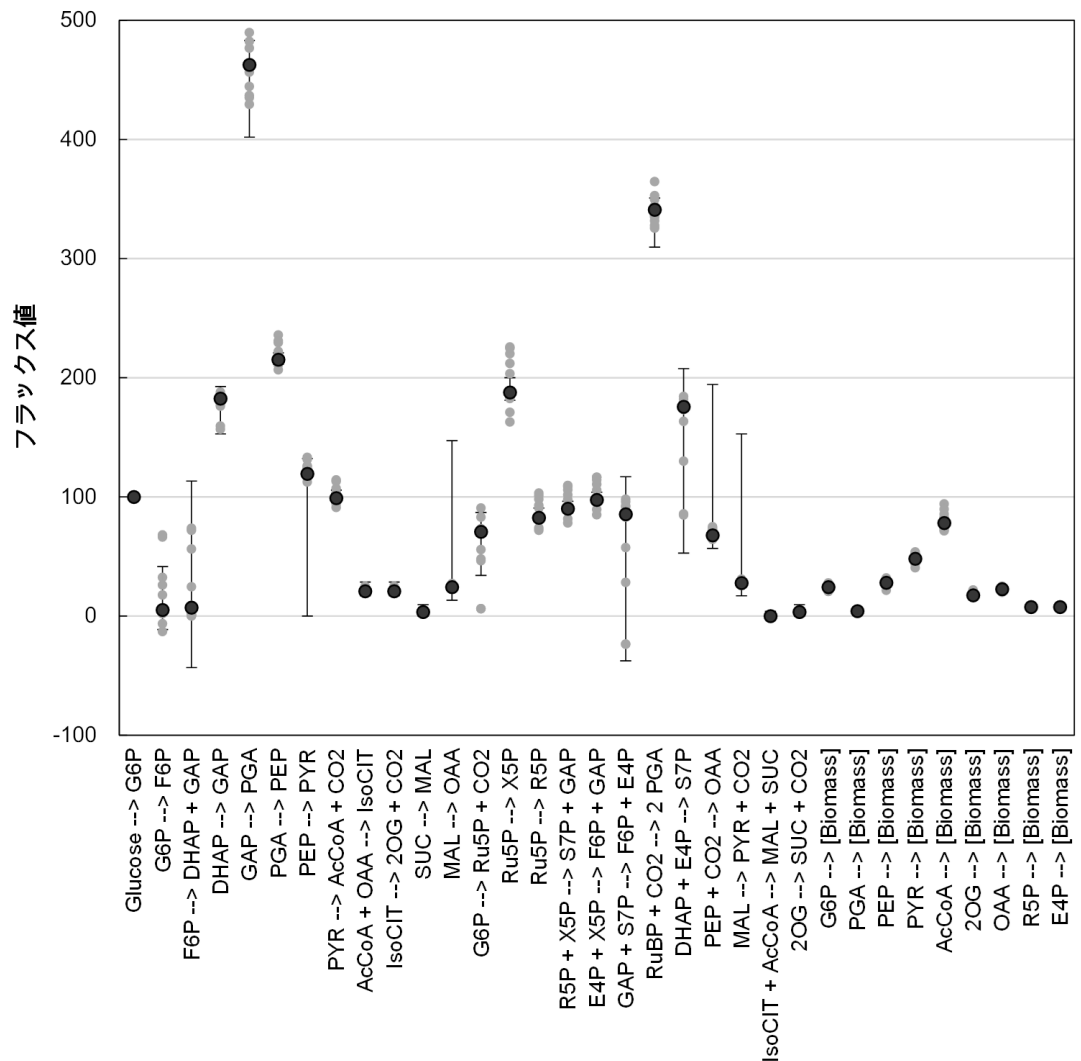


Fig S-2. バイオマス合成フラックスの誤差が代謝フラックス推定に与える影響。
 10%のガウシアンノイズを加えたバイオマス合成フラックスを用いて、代謝フラックス分布を推定するという試行を 10 回繰り返した。推定された代謝フラックス値を glucose の取り込みフラックスを 100 とした相対値で示す。黒のシンボルは、Fig. 2-17 に示すベストフィットの代謝フラックス値であり、その 95%信頼区間をエラーバーで示す。これに対して、バイオマス合成フラックスにノイズを与えた場合の代謝フラックス推定結果を灰色の点で示す。10 通りの誤差パターンについて試行したため、各反応について 10 個の代謝フラックス推定結果がプロットされている。この結果より、少なくともバイオマス合成フラックスがばらついていても、代謝フラックス分布全体の傾向が変わりはしないことが分かった。誤差を加えた場合のベストフィットは、誤差を加えない場合の 95%信頼区間の範囲に概ね含まれることも分かる。

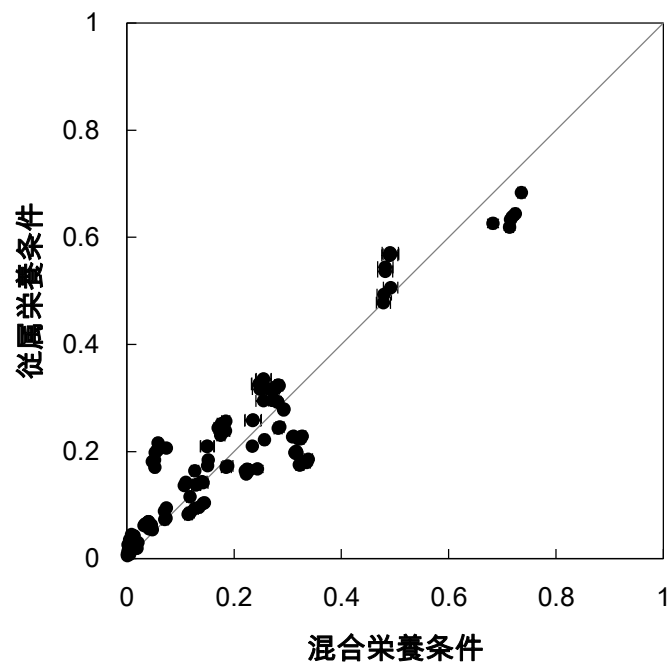
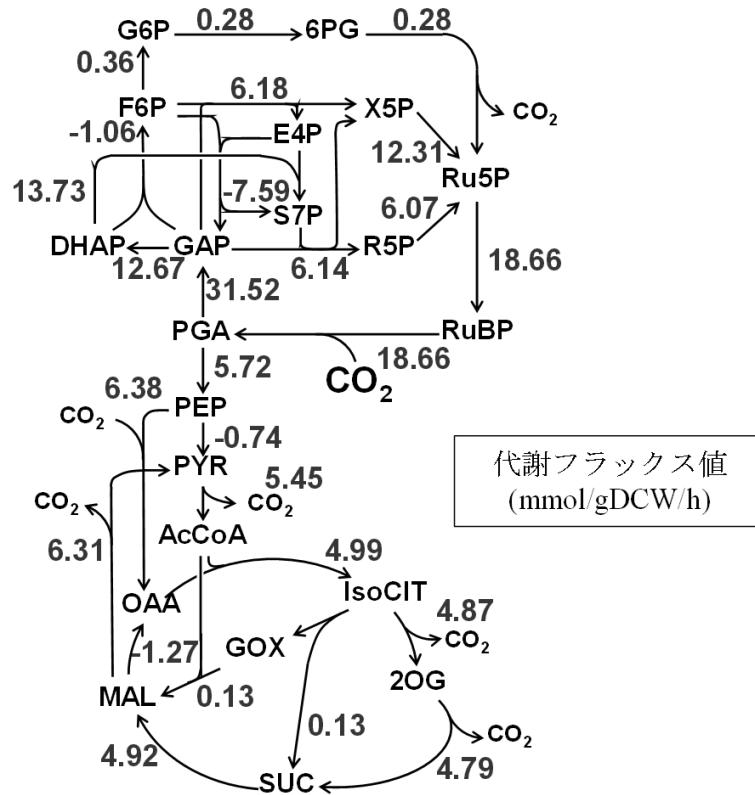


Fig. S-3 混合栄養条件および従属栄養条件におけるタンパク質構成アミノ酸の MDV の比較. エラーバーは 3 回の実験の標準偏差を示す. 使用した glucose の ^{13}C 標識パターンは両条件で同一であるため, アミノ酸の MDV の差は代謝フラックス分布の変化によって生じたと推測される.

A



B

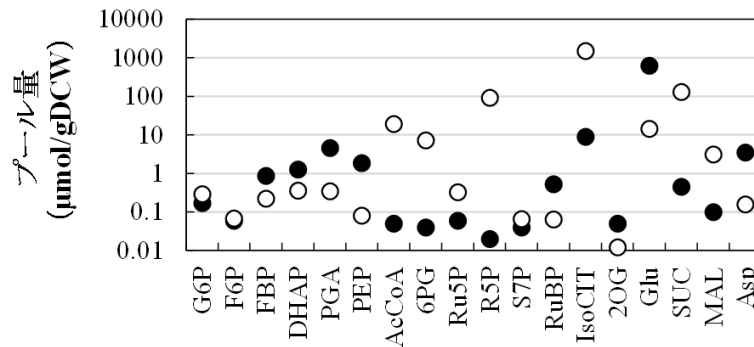


Fig. S-4 プール量に制約を設けずにフィッティングを行った結果 (第3章). 推定された代謝フラックス分布 (A), 代謝物質プール量 (B) を示す. (B) では実測値 (●) と推定された値 (○) を示す. 代謝フラックスと代謝物質プール量の変化のどちらでも MDV の時間変化を説明できるため, フィッティング後のプール量は, 実測値と相関が小さくなる.

Table S-1 第2章の代謝フラックス解析に使用した代謝反応モデル

代謝反応	炭素の移動
Glucose --> G6P	ABCDEF --> ABCDEF
G6P <-> F6P	ABCDEF <-> ABCDEF
F6P <-> DHAP + GAP	ABCDEF <-> CBA + DEF
DHAP <-> GAP	ABC <-> ABC
GAP <-> 3PG	ABC <-> ABC
3PG <-> PEP	ABC <-> ABC
PEP --> PYR	ABC --> ABC
PYR --> AcCoA + CO ₂	ABC --> BC + A
AcCoA + OAA --> IsoCIT	AB + CDEF --> FEDBAC
IsoCIT --> 2OG + CO ₂	ABCDEF --> ABCDE + F
SUC <-> MAL	ABCD <-> ABCD
MAL <-> OAA	ABCD <-> ABCD
G6P --> Ru5P + CO ₂	ABCDEF --> BCDEF + A
Ru5P <-> X5P	ABCDE <-> ABCDE
Ru5P <-> R5P	ABCDE <-> ABCDE
R5P + X5P <-> S7P + GAP	ABCDE + FGHIJ <-> FGABCDE + HIJ
E4P + X5P <-> F6P + GAP	ABCD + EFGHI <-> EFABCD + GHI
GAP + S7P <-> F6P + E4P	ABC + DEFGHIJ <-> DEFABC + GHIJ
Ru5P + CO ₂ --> 2 × 3PG	ABCDE + F --> CDE + FBA
DHAP + E4P --> S7P	ABC + DEFG --> CBADEFG
PEP + CO ₂ --> OAA	ABC + D --> ABCD
MAL --> PYR + CO ₂	ABCD --> ABC + D
IsoCIT + AcCoA --> MAL + SUC	ABCDEF + GH --> ABHG + FCDE
2OG --> SUC + CO ₂	ABCDE --> BCDE + A

Table S-2 代謝フラックス算出結果とその 95%信頼区間 (第 2 章)

代謝反応	混合栄養条件		従属栄養条件	
	ベスト	95%	ベスト	95%
	フィット	信頼区間	フィット	信頼区間
G6P --> F6P	0.03	-0.06 to 0.22	-0.84	-0.90 to -0.77
F6P --> DHAP + GAP	-0.04	-0.60 to 0.23	-0.16	-0.22 to 3.86
DHAP --> GAP	-0.97	-1.02 to -0.81	-0.16	-0.22 to -0.10
GAP --> 3PG	-2.45	-2.56 to -2.13	0.01	-0.11 to 0.13
3PG --> PEP	1.14	1.12 to 1.17	0.60	0.60 to 0.61
PEP --> PYR	0.63	0.00 to 0.70	0.39	0.00 to 0.41
PYR --> AcCoA + CO ₂	0.52	0.51 to 0.56	0.27	0.27 to 0.28
AcCoA + OAA --> IsoCIT	0.11	0.09 to 0.15	0.05	0.05 to 0.06
IsoCIT --> 2OG + CO ₂	0.11	0.09 to 0.15	0.05	0.05 to 0.06
SUC --> MAL	0.02	0.00 to 0.05	0.00	0.00 to 0.01
MAL --> OAA	-0.13	-0.78 to -0.07	-0.01	-0.41 to 0.00
G6P --> Ru5P + CO ₂	0.37	0.18 to 0.46	1.35	1.28 to 1.41
Ru5P --> X5P	-0.99	-1.06 to -0.96	0.68	0.65 to 0.67
Ru5P --> R5P	-0.44	-0.48 to -0.42	0.37	0.36 to 0.37
R5P + X5P --> S7P + GAP	-0.48	-0.51 to -0.46	0.35	0.34 to 0.35
E4P + X5P --> F6P + GAP	-0.52	-0.55 to -0.50	0.33	0.31 to 0.33
GAP + S7P --> F6P + E4P	0.45	-0.20 to 0.62	0.35	0.34 to 4.41
RuBP + CO ₂ --> 2 3PG	1.81	1.64 to 1.86	0.30	0.24 to 0.36
DHAP + E4P --> S7P	0.93	0.28 to 1.10	0.00	0.00 to 4.04
PEP + CO ₂ --> OAA	0.36	0.30 to 1.03	0.13	0.11 to 0.53
MAL --> PYR + CO ₂	0.15	0.09 to 0.81	0.01	0.00 to 0.42
IsoCIT + AcCoA --> MAL + SUC	0.00	0.00 to 0.02	0.00	0.00 to 0.01
2OG --> SUC + CO ₂	0.02	0.00 to 0.05	0.00	0.00 to 0.01

Table S-3 第3章の代謝フラックス解析に使用した代謝モデル

代謝反応	炭素の移動
G6P <-> F6P	ABCDEF --> ABCDEF
F6P <-> FBP	ABCDEF --> ABCDEF
FBP <-> DHAP + GAP	ABCDEF --> CBA + DEF
DHAP <-> GAP	ABC --> ABC
GAP <-> PGA	ABC --> ABC
PGA <-> PEP	ABC --> ABC
PEP <-> PYR	ABC --> ABC
PYR --> AcCoA + CO ₂	ABC --> BC + A
G6P --> 6PG	ABCDEF --> ABCDEF
6PG --> Ru5P + CO ₂	ABCDEF --> BCDEF + A
Ru5P --> RuBP	ABCDE --> ABCDE
RuBP + CO ₂ --> PGA	ABCDE + F --> FBA + CDE
Ru5P <-> X5P	ABCDE --> ABCDE
Ru5P <-> R5P	ABCDE --> ABCDE
R5P + X5P <-> S7P + GAP	ABCDE + FGHIJ --> FGABCDE + HIJ
E4P + X5P <-> F6P + GAP	ABCD + EFGHI --> EFABCD + GHI
GAP + S7P <-> F6P + E4P	ABC + DEFGHIJ --> DEFABC + GHIJ
DHAP + E4P <-> S7P	ABC + DEFG --> CBADEFG
AcCoA + OAA --> IsoCIT	AB + CDEF --> FEDBAC
IsoCIT --> 2OG + CO ₂	ABCDEF --> ABCDE + F
2OG --> SUC + CO ₂	ABCDE --> BCDE + A
SUC <-> MAL	ABCD --> ABCD
MAL <-> OAA	ABCD --> ABCD
PEP + CO ₂ --> OAA	ABC + D --> ABCD
MAL --> PYR + CO ₂	ABCD --> ABC + D
IsoCIT --> GOX + SUC	ABCDEF --> AB + FCDE
AcCoA + GOX --> MAL	AB + CD --> CDBA
OAA <-> Asp	ABCD --> ABCD

Table S-4 第4章の代謝フラックス解析に使用した代謝モデル

代謝反応	炭素の移動
glycogen <-> G6P	ABCDEF --> ABCDEF
G6P <-> F6P	ABCDEF --> ABCDEF
F6P <-> DHAP + GAP	ABCDEF --> CBA + DEF
DHAP <-> GAP	ABC --> ABC
GAP <-> PGA	ABC --> ABC
PGA <-> PEP	ABC --> ABC
PEP <-> PYR	ABC --> ABC
PYR --> AcCoA + CO ₂	ABC --> BC + A
G6P --> 6PG	ABCDEF --> ABCDEF
6PG --> Ru5P + CO ₂	ABCDEF --> BCDEF + A
Ru5P --> RuBP	ABCDE --> ABCDE
RuBP + CO ₂ --> PGA	ABCDE + F --> FBA + CDE
Ru5P <-> X5P	ABCDE --> ABCDE
Ru5P <-> R5P	ABCDE --> ABCDE
R5P + X5P <-> S7P + GAP	ABCDE + FGHIJ --> FGABCDE + HIJ
E4P + X5P <-> F6P + GAP	ABCD + EFGHI --> EFABCD + GHI
GAP + S7P <-> F6P + E4P	ABC + DEFGHIJ --> DEFABC + GHIJ
DHAP + E4P --> S7P	ABC + DEFG --> CBADEFG
AcCoA + OAA --> IsoCIT	AB + CDEF --> FEDBAC
IsoCIT --> 2OG + CO ₂	ABCDEF --> ABCDE + F
2OG --> SUC + CO ₂	ABCDE --> BCDE + A
2OG <-> Glu	ABCDE --> ABCDE
Glu --> SUC + CO ₂	ABCDE --> BCDE + A
SUC <-> FUM	ABCD --> ABCD
FUM <-> MAL	ABCD --> ABCD
MAL <-> OAA	ABCD --> ABCD
PEP + CO ₂ --> OAA	ABC + D --> ABCD
MAL --> PYR + CO ₂	ABCD --> ABC + D
IsoCIT --> GOX + SUC	ABCDEF --> AB + FCDE
AcCoA + GOX --> MAL	AB + CD --> CDBA
OAA --> FUM	ABCD --> ABCD

Table S-5 リアクターを用いた培養における，乾燥菌体重量 (g/OD₇₃₀/L) の変化

Time (h)	野生株		Δnrt	
	1 回目	2 回目	1 回目	2 回目
0	0.28		0.24	
12		0.32		
15	0.32	0.36		
18	0.32	0.32		
21	0.3			
24	0.32		0.36	0.4
48	0.32		0.36	0.36
72	0.28		0.36	0.38
96	0.38		0.36	
120	0.42		0.32	

1 回目の培養は 4-3-3, 2 回目の培養は 4-3-4 である.

本論文で用いた略語

- ACO : アコニット酸 (aconitate)
- ATP : アデノシン3リン酸 (adenosine 5'-triphosphate)
- AcCoA : アセチル-CoA (acetyl-coenzymeA)
- BPG : 1,3-ビスホスホグリセリン酸 (1,3-bisphosphoglycerate)
- CIT : クエン酸 (citrate)
- DCW : 乾燥菌体重量 (dry cell weight)
- DHAP : ジヒドロキシアセトンリン酸 (dihydroxyacetone phosphate)
- EMU : elementary metabolite unit
- E4P : エリトロース 4-リン酸 (erythrose 4-phosphate)
- F6P : フルクトース 6-リン酸 (fructose 6-phosphate)
- FBP : フルクトース 1,6-ビスリン酸 (fructose 1,6-bisphosphate)
- FUM : フマル酸 (fumarate)
- GABA : γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid)
- GAP : グリセルアルデヒド 3-リン酸 (glyceraldehyde 3-phosphate)
- GAPDH : グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ
(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
- GOGAT : グルタミンオキソグルタレートアミドトランスフェラーゼ
(glutamine oxoglutarate amidotransferase)
- GOX : グリオキシル酸 (glyoxylate)
- G6P : グルコース 6-リン酸 (glucose 6-phosphate)
- G1P : グルコース 1-リン酸 (glucose 1-phosphate)
- GS : グルタミンシンテターゼ (glutamine synthetase)
- GT 株 : グルコース耐性株 (glucose tolerant)
- IsoCIT : イソクエン酸 (isocitric acid)
- MAL : リンゴ酸 (malate)
- 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
(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
- NADP : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
- Nrt : 硝酸トランスポーター (nitrate transporter)
- OAA : オキサロ酢酸 (oxaloacetic acid)
- 2OG : 2オキソグルタル酸 (α -ketoglutaric acid)
- OPP経路 : 酸化的ペントースリン酸経路 (oxidative pentose phosphate pathway)
- PCR : polymerase chain reaction

PEP : ホスホエノールピルビン酸 (phosphoenolpyruvate)
Pgi : ホスホグルコースイソメラーゼ (phosphoglucose isomerase)
6PG : 6-ホスホグルコン酸 (6-phosphogluconate)
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)
PGL : 6-ホスホグルコノラクトン (6-phosphogluconolactone)
PSO : 粒子群最適化 (particle swarm optimization)
PYR : ピルビン酸 (pyruvate)
qRT-PCR : 定量逆転写PCR (quantitative reverse-transcription PCR)
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)
RuBisCO : リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ
(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase)
RuBP : リブロース 1,5-ビスリン酸 (ribulose 1,5-bisphosphate)
SBP : セドヘプツロース 1,7-ビスリン酸 (Sedoheptulose 1,7-bisphosphate)
S7P : セドヘプツロース 7-リン酸 (sedoheptulose 7-phosphate)
SUC : コハク酸 (succinate)
SSA : コハク酸セミアルデヒド (succinic semialdehyde)
Synechocystis : *Synechocystis* sp. PCC 6803
TCAサイクル : トリカルボン酸サイクル (tricarboxylic acid cycle)
X5P : キシルロース 5-リン酸 (xylulose 5-phosphate)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、大阪大学工学部応用自然科学科 4 回生から大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻の博士前期課程および博士後期課程の合計 6 年間にわたり、研究の場を与えて下さり、終始暖かく、御指導、御助言を賜りました大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻代謝情報工学講座、清水浩教授に心より御礼申し上げます。博士論文審査委員として、有益な御指導、御助言を頂きました大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻の松田秀雄教授、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。博士後期課程のアドバイザー委員として有益な御指導、御助言を頂きました大阪大学大学院薬学研究科原田和生講師に心より感謝申し上げます。代謝情報工学講座の松田史生准教授には、神戸大学大学院工学研究科に在任されていた際に分析でお世話になり、大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻へ着任されて以来は研究方針や実験手法について大変有益なアドバイスを下さいました。心より感謝申し上げます。実験方法や研究の仕方について基礎から指導して下さいました代謝情報工学講座の平沢敬招へい准教授に心より感謝申し上げます。有益で幅広い知識で、有益な御助言を頂きました奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科の小野直亮助教（元代謝情報工学講座特任准教授）に心より感謝申し上げます。研究の詳細を最も身近に指導して下さい、培養系の構築から現在に至るまで長い時間を割いて御指導下さった吉川勝徳助教に深く感謝いたします。培養から解析手法までの確かな御助言を下された戸谷吉博特任助教に深く感謝申し上げます。本研究に使用した *Synechocystis* sp. PCC 6803 を快くご提供下さった、崇城大学生物生命学部応用微生物工学科松岡正佳教授に心より感謝申し上げます。シアノバクテリアの研究方法について様々なアドバイスを下さった、筑波大学生命環境科学研究科の鈴木石根教授、ならびに理化学研究所生命システム研究センターの鈴木真吾博士に深く感謝いたします。理化学研究所バイオマス工学研究プログラムの白井智量博士には、実験技術から私事に至るまで、親身に相談に乗って頂きました。厚く、御礼申し上げます。CE-MS 分析にご協力頂いた森佑紀氏、糸賀達也氏に心より感謝いたします。代謝フラックス解析に必要なサンプリングにご協力頂いた、当時代謝情報工学講座に所属されていた堀之内貴明博士、森英詞博士、長廻達也氏、河崎優樹氏に心より感謝いたします。梶嶋秀一氏には解析プログラムで大変お世話になりました。厚く感謝いたします。岡橋伸幸氏にはサンプリングに協力頂いたほか、分析面でお世話になることが多く、大変感謝しています。博士前期課程修了までの 3 年間の研究室生活を共に過ごした、犬石浩嗣氏、小嶋悠太氏、田中章太郎氏、山内雄人氏、博士後期課程まで 6 年間を過ごした大野聡氏、梶嶋秀一氏に感謝しております。また数々の面でお世話になりました代謝情報工学講座のみなさまに感謝いたします。どうもありがとうございました。最後に、これまでの学生生活のあらゆる面で深い愛情を持って支えて頂いた両親に、深く感謝いたします。