The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Bacillus licheniformis ATCC 9945のpoly(g-glutamic acid)生産量の向上及び分子量低下の抑制
Author(s)	光永, 均
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/59605
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士学位論文

Bacillus licheniformis ATCC 9945 の poly(γ-glutamic acid)生産量の向上及び分子量低下の抑制

光永　均

2016 年 4 月

大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻　生物工学コース
生物資源工学領域

目次

略号 1
第 1 章　緒論 2
1.1.　Poly(γ-glutamic acid) 4
1.2.　PGA 生産に関する先行研究 7
1.2.1.　PGA 生産菌 7
1.2.2.　PGA 生産機構 7
1.2.3.　外的要因の PGA 生産へ与える影響 9
1.3.　カーボンカタボライト制御 11
1.4.　メタボロミクス 13
1.5.　本研究の目的 14
第 2 章　PGA 生産量の向上に資する *B. licheniformis* ATCC 9945 のメタボローム解析 18
2.1.　緒言 18
2.2.　実験方法 19
2.2.1.　試薬 19
2.2.2.　菌株と培養方法 19
2.2.3.　培地成分の分析 20
2.2.4.　メタボローム解析 21
2.3.　結果と考察 23
2.3.1.　菌体の増殖と培養液中成分の経時変化 23
2.3.2.　メタボローム解析結果 25
2.3.3.　PGA 生産量の向上を目指した Citrate 添加培養 32
2.3.4.　断続的 citrate 及び ammonium 添加による更なる PGA 生産量の向上 34
2.4.　小括 36
第 3 章　分岐鎖アミノ酸による PGA 分子量低下の抑制 38
3.1.　緒言 38
3.2.　実験方法 40
3.2.1.　試薬 40
3.2.2.　菌株と培養条件 40
3.2.3.　培地成分の分析 40
3.2.4.　メタボローム解析 40
3.3.　結果と考察 41
3.3.1.　菌体の増殖と培養液中成分の経時変化 41
3.3.2.　PGA の分子量推移 44
3.3.3.　メタボローム解析 46
3.3.4.　分岐アミノ酸添加による PGA 発酵への影響 49

3.4.　小括 56
第 4 章　総括 57
謝辞 60
引用文献 61
発表論文 71
学会発表 72
付録 75

略号

PGA: Poly(γ-glutamic acid)

PTS: Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system

CcpA: Catabolite control protein A

HPr: Histidine containing protein

HPrK: HPr kinase/phosphatase

LC/MS/MS: Liquid chromatography/tandem mass spectrometry

SEC: Size exclusion chromatography

OD: Optical density

QC: Quality control

LOWESS: Locally weighted scatterplot smoothing

PCA: Principal component analysis

OPLS-DA: Orthogonal partial least squares-discrimination analysis

VIP: Variable importance in projection

GOGAT: Glutamine oxoglutarate aminotransferase (glutamate synthase)

GS: glutamine synthetase

BCAAs: Branched-chain amino acids

M_w: Weight average molecular weight

M_n: Number average molecular weight

※代謝物の略号については付録 表 1 の MRM トランジションに付記する.

第1章 緒論

現代の生活においてポリマーは欠かせない存在となっている．しかしながら現在使用されているポリマーのほとんどが化石燃料を原料としており，石油枯渇問題や環境問題の観点から，環境への負荷の少ない生物由来のバイオポリマーに注目が集まっている．

ポリアミノ酸はポリアミド類に分類され，生物分解が可能なバイオポリマーとして注目されている．本論文で述べるポリアミノ酸はタンパク質とは異なり，(i)主鎖の炭素骨格が単一アミノ酸で構成され，(ii)DNA の転写，翻訳のメカニズムとは別の機構で生成され，(iii)アミド結合を形成するアミノ酸残基がα位同士に限らない，という特徴を持つ生物由来のポリマーである．

自然界で生産されるポリアミノ酸のなかでも以下に上げる3種類のポリマーは広く知られている．まず poly(ε-lysine) (PL) は lysine を構成単位としており，α位のカルボキシル基がε位のアミノ基と結合している(図 1.1A) (1)．次に Cyanophycin はα位同士で結合した aspartic acid のβ位のカルボキシル基に arginine が結合した構造をとる (図 1.1B) (2)．そして poly(γ-glutamic acid) (PGA)は後述される数多くの特性から最も研究が盛んなバイオポリマーの一つである (図 1.1C). 本研究ではこの PGA に焦点を当てて研究を行った.

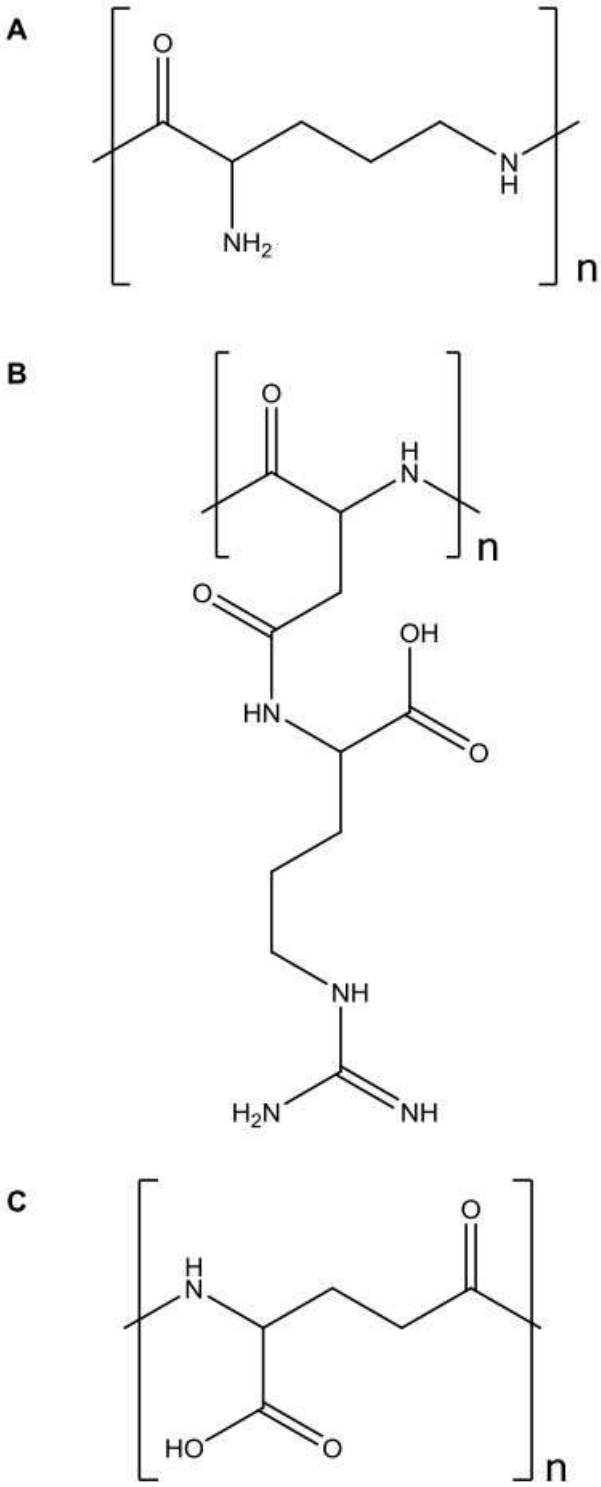

図 **1.1** 代表的なポリアミノ酸の構造式．**A** は **poly(ε-lysine)**，**B** は **cyanophycin**，**C** は **poly(γ-glutamic acid).**

1.1. Poly(γ-glutamic acid)

Poly(γ-glutamic acid) (PGA)は 1937 年に Ivànovics らによって *Bacillus anthracis* と *B. mesentericus* の莢膜の成分として初めて発見された (3). そして納豆の糸の主成分としても報告されている (4). PGA は glutamic acid がα位のアミノ基とγ位のカルボキシル基がアミド結合した構造をとり，L-体のみで構成される L-PGA，D-体のみで構成される D-PGA，そして DL の両異性体が混成する DL-PGA が存在する 図 1.1C). この構造を一般的なプロテアーゼは認識できないため, *Bacillus anthracis* (炭疽病菌)は生体内に侵入した際に PGA を莢膜成分として細胞を覆うことで宿主の生体防御から自身を守っていると考えられている (5).

PGA は化学的に合成することが困難なため主に微生物, 特に低 GC 含有グラム陽性細菌を用いた発酵によって生産されている. 分子量は生産主によって差があるが, 100 kDa から 2,500 kDa を超えるものが報告されている．3 次元構造は溶液の環境で変化するが，基本的にはらせん構造をとる (6).

PGA は非常に多くの特性を持つ．まず，PGA は納豆の糸の構成成分としても知られていることからも，可食性と生分解性があり，環境そして生物に対して無害であるとされている (7–9). また，高い保水性を持ち，自重の 5000 倍の水を保持できるとされている (10). さらに, 高度にネガティブチャージしている化合物であり Ca^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}，Zn^{2+}，Mn^{2+}などの金属イオンに対して高い吸着性を持つ (11,12). 加えて，PGA は同じ glutamic acid を構成単位とする poly(α-glutamic acid)と比べ，主鎖が長く側鎖のカルボキシル基の間隔が広いため立体障害が少なく，化学的な修飾も行いやすいという特徴を持つ (13).

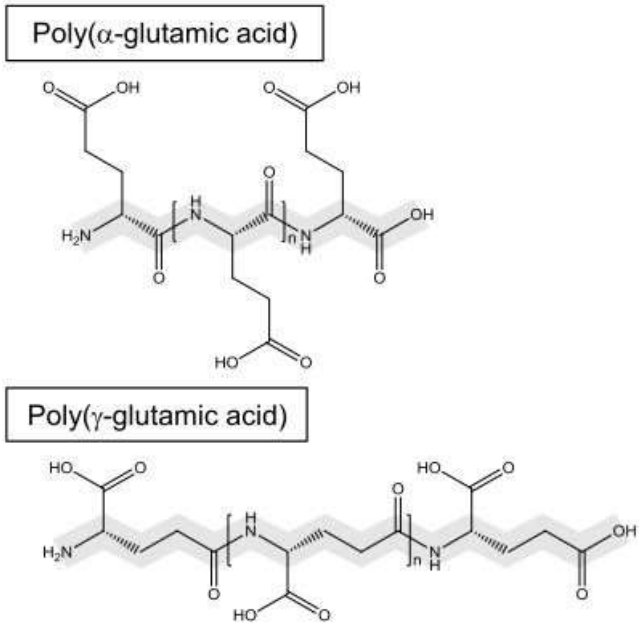

図 1.2 Poly(α-glutamic acid)と poly(γ-glutamic acid)の構造．主鎖を影付きで表した．

このような特性から PGA とそれを基盤材料とした派生物質は幅広い分野ですでに利用されており，さらなる応用へ向けた研究開発が行われている．以下に各業界における例をあげる．

＜食品＞

PGA はミネラルを多量に含む食品におけるミネラル成分の吸収促進剤として利用されている (14)．さらに PGA には金属イオンなどによる外来的な味の変化をマスキングする効果も知られている．また，呈味性が低いため，凍結防止剤としても用いることができると期待されている (15)．その他にも PGA の特徴的な物性である高い粘性を利用して増粘剤や食感の調整に用いられている．

＜化粧品＞

PGA は自重の 5000 倍の水分を吸収できる性質を持っていることから，天然の保湿剤として配合されている．さらに，その保湿作用によって髪に水分を保持させることでブリーチの際の髪の痛みを防ぐ効果も知られている (16).

＜水質処理＞

PGA は幅広い有機物や無機物に対して凝集作用を持つ．Taniguchi らは架橋した PGA が河川や池などの汚染水の浄化に有効であることを報告している (17).

＜薬品＞

PGA は可食性で生分解性の物質であることに加え, 側鎖のカルボキシル基は薬効成分と相互作用することでその成分を抱合し，これにより薬の溶解性や吸収率などをコントロールすることができるためドラッグデリバリーシステムの素材として注目されている．例えば，抗癌剤の一種である paclitaxel は元来水にほとんど溶けないため従来はポリオキシエチレンヒマシ油とエタノールに溶解されていが，Li らは PGA と paclitaxel の抱合体を作成し，水溶性を持たせることに成功した (18)．前臨床試験の結果から，本抱合体は paclitaxel 単体に比べ，最大 5 倍のがん細胞への取り込まれることが確認された．さらに Singer らが作成した PGA と paclitaxel の抱合体である paclitaxel poliglumex (PPX)は前臨床試験の結果から薬効成分の効果継続時間を延長し，さらに拡散による薬効成分の分散を低減させることに成功した (19).

＜細胞培養＞

一般的に組織工学では足場に用いる生分解性ポリマーに chitosan が用いられる．Hsieh らは chitosan へ PGA を混ぜることにより，表面の水への親和性，吸水性，膨潤率を向上させることに成功した．この培地を用いることにより細胞密度が 3 倍にまで向上したと報告している (20).

＜生分解性プラスチック＞

PGA の主鎖はポリアミドであるナイロンと類似した構造を持つ．これを利用し Ashiuchi らは PGA と hexadecylpyridinium cation を混合することで疎水性を持つ PGAIC という複合体が生成可能であることを示した (21)．PGAIC は熱可塑性を持ち，大きさや形状をプレスによって整形できると可能性を持っている．さらに PGAIC は塩や酸塩基といった化学的な影響に対して安定であり，グラム陽性，及びグラム陰性細菌や病原菌さらには糸状菌などの微生物の増殖を阻害する抗菌性を持つことも明らか

となった.

この他にも土壌肥料，造影剤，DNA ベクターなどの研究も進んでおり，PGA の応用研究への期待はより一層強くなってきている.

1.2. PGA 生産に関する先行研究

1.2.1. PGA 生産菌

前項で述べたとおり，PGA は高い有用性を持つことから，その生産性に関わる研究が広く行われている (22). これまでに PGA 生産能力を持つ微生物種は幅広い種にわたって報告されており，例えば，*Bacillus subtilis*，*B. licheniformis*，*B. anthracis*，*B. megaterium*，*B. pumilus*，*Planococcus halophilus*，*Sporosarcina halophile*，*Staphylococcus epidermidis*，*Natrialba aegyptiaca* などが挙げられている ．種や株の違いによって生産する PGA の量や構造 (分子量や DL 比), さらに生産に必要な成分も異なることがわかっている． PGA 生産菌の中でも，*B. licheniformis* と *B. subtilis* はその生産性の高さ，株によっては 1,000 kDa を超える PGA を生産できることが特徴として挙げられる. そして *B. anthracis* などは莢膜として PGA を生産するのに比べ，*B. licheniformis* と *B. subtilis* は培地中に PGA を生産するため，その回収の容易さから実験に用いるモデル株から工業的な実生産にも利用されている.

1.2.2. PGA 生産機構

PGA は D-体を含むことからもわかるようにリボソームに依存せず生合成されると考えられている. *B. subtilis* と *B. licheniformis* において PGA の合成に必要な PGA synthase 複合体 (PgsBCA) は *pgsBCA* によってコードされており，膜タンパク質である. Troy らの報告では，*B. licheniformis* を用いた研究により PGA の伸長反応はチオテンプレート依存ペプチド合成機構によって行われていると推測された (図 1.3A) (23). しかしながら，近年の Ashiuchi らの *B. subtilis* を用いた研究ではアミド連結機構

によって行われている可能性が報告されている (図 1.3B) (24,25). この予測された 2 つの反応機構によって生成されるペプチドの大きな違いは，チオテンプレート依存ペプチド合成機構は DL-体を区別して配列が規則的であることに比べ，アミド連結機構は不規則であることである．*B. licheniformis* は 100%D-体の PGA を条件によっては生産可能なのに対して，*B. subtilis* が 100%D-体の PGA を生産した報告はなく，そのため未だに PGA の伸長反応についてはいずれの反応が正しいのかは定かではない．Wang らは *B. licheniformis* WBL-3 と ATCC 14580 の *pgsBCA* の全体としての塩基配列の相同性が 97%であったのに対して，*B. licheniformis* WBL-3 と *B. subtilis* IFO 3336 では 74%であったことを報告しており (26), それぞれの種において反応機構が異なる可能性の一因として示されている．いずれの場合においても，PGA の伸長反応は ATP を利用して glutamate を活性化して行われる．

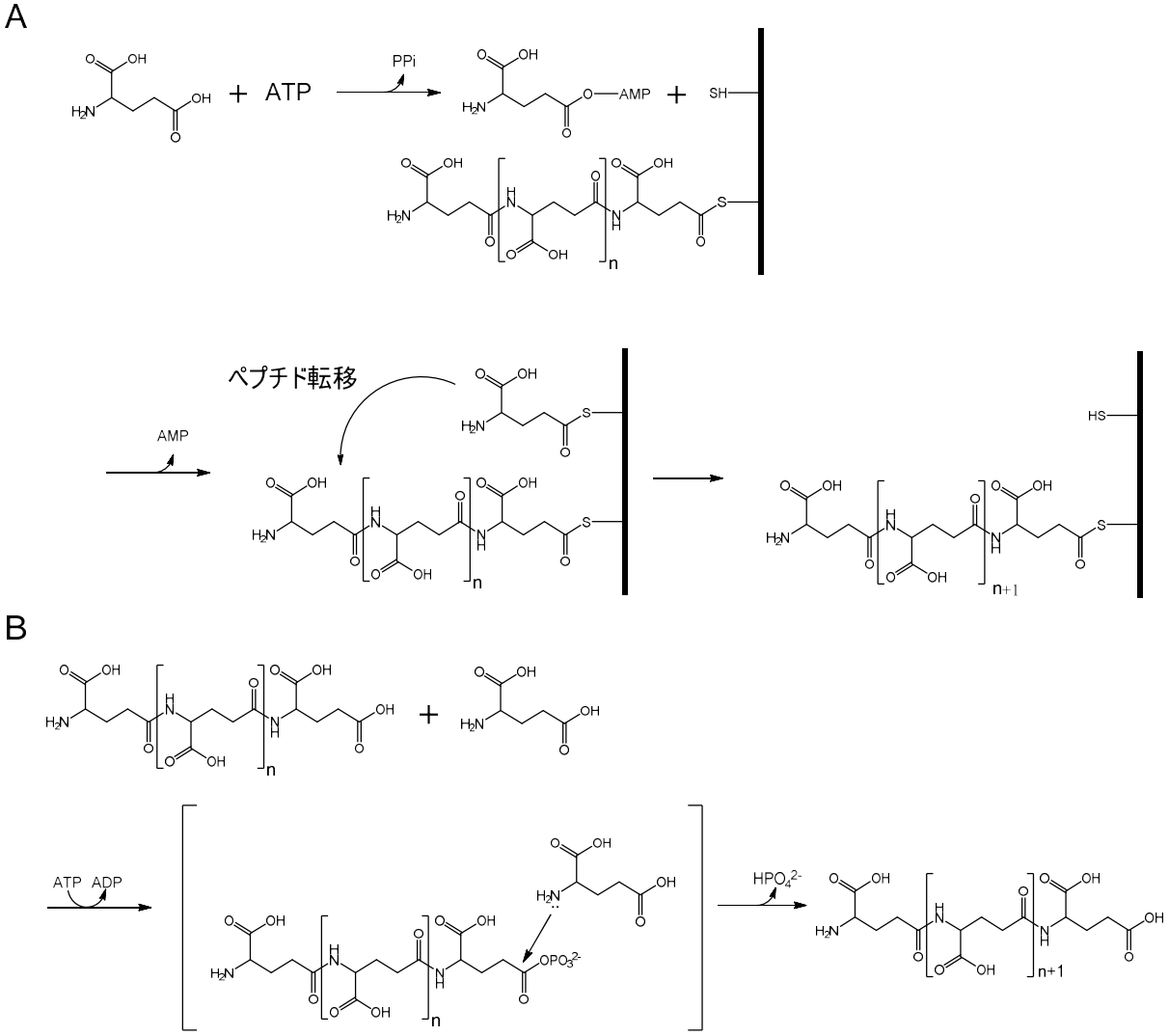

図 1.3 予測される PGA synthetase が触媒する PGA 伸長反応機構．チオテンプレート依存ペプチド合成機構を A (23)，アミド連結機構を B に示した (24,25).

1.2.3. 外的要因の PGA 生産へ与える影響

Bacillus 属を用いた PGA の生産は，菌株の違い以外にも培養条件によって，生産量や生産速度，さらに PGA の分子量や DL 比などが異なる．この中でも最終生産量と分子量は, PGA を工業的に生産, 利用していくうえで重要な要素として注目されており, これまでに多くの研究者がその両者に注目して研究を行ってきた．特に培地や培養の条件の違いは PGA の生産に大きな影響を与えることから数多くの研究が行われてき

た．

PGA は細胞外へ放出される高分子であり，生産された PGA によって培地は高い粘性を持つようになる．この粘性の増加は酸素の供給の妨げとなり，PGA 生産量の低下に繋がる．Cromwick らは *B. licheniformis* ATCC 9945 を用いて通気条件と振盪条件の PGA 生産に対する影響について報告している (27)．彼らの結果によると，酸素供給を高めることで炭素源の消費が増し，菌体増殖と PGA 生産も高まっていた．その一方で，高酸素条件下では PGA の分子量は低酸素条件に比べて低く，この影響は振盪速度が高い場合に分子量が低下する結果と類似したものであった．また，Richard と Margaritis は *B. subtilis* IFO 3335 を用いて一定通気条件下における培養中の酸素取り込み速度，総括酸素移動係数 (k_La)や培養液の粘性について経時的に検討した (28)．その結果，酸素の要求性は増殖期である対数増殖期に最高となること，そして対数増殖期の後期から定常期にかけて粘性が最も高まり，この粘性の高まりとともに k_La が低下していっていたことが明らかとなった．つまり生産された PGA は気液界面における酸素の移動を妨げることが明らかとなった．

次に培地組成について，窒素源については有機窒素では生産性が低く，アンモニウムのような無機窒素が高い生産性を示すと報告されている (29)．一方で，硝酸イオンのみを窒素源とした場合は PGA の生産量を低下させることも報告されている (30)．また，金属塩についても研究が行われており，これまでに $CaCl_2$ や $MnSO_4$ が PGA の収量や構造に大きな影響を与えることが報告されている(31,32)．菌株によって PGA の生産に L-glutamate が必須のものとそうでないものが存在するが, L-glutamate 非依存の菌株でも L-glutamate によって生産が促進されることから多くの場合, 培地に添加されている．また，炭素源についても菌株によって異なるが，glycerol，もしくは glucose が用いられることが多い．Ko と Gross は *B. licheniformis* ATCC 9945 を用いて glycerol と glucose が PGA の生産へ与える影響を検討した (33)．その結果，glucose は増殖を促進するが PGA の生産量が低いのに対して，glycerol は逆に増殖は低いが PGA の生

産を促進した．また，Troy らは glycerol が PGA synthetase の活性を高める可能性を示唆している (34). また，Wu らは glycerol が PGA の生産だけでなく，PGA の分子量を低下させる効果をもつことを報告している (35).

このように，細胞外からの影響による PGA 生産の変化を検討した研究は数多く報告されている一方で，それぞれの摂動が細胞内の代謝に及ぼす影響について研究した例は数少なく，多くの研究が経験則的に PGA の発酵の制御に取り組んでいる．

1.3. カーボンカタボライト制御

多くの微生物は外部の環境に合わせて細胞内の代謝を制御して適応することが知られている．その中でも，培地中の利用できる炭素源に合わせて行われる代謝制御はカーボンカタボライト制御と呼ばれ，幅広い種で確認されている．これはその生物種にとって生育に有利な炭素源を優先的に消費するための制御機構と考えられている．例えば，*Escherichia coli* は，cyclic AMP (cAMP) 受容体タンパク質 (cAMP receptor protein: CRP)が多くの遺伝子の発現を制御している．そして CRP は cAMP と結合することにより活性化する．培地中の glucose 量によって，adenylate cyclase の活性が変化することで細胞内の cAMP 濃度が変化し，これにより CPR の活性が変化し，遺伝子発現が制御されている．

一方で，PGA 生産菌の多くが含まれるグラム陽性低 GC 含量細菌はこの cAMP-CRP 制御系をもたず，特定の細胞内代謝物の濃度に依存してグローバル制御タンパク質の活性が変化することで，種々の遺伝子発現を制御している．例えばこの制御系において，培地中の糖が phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS)によって細胞内へ取り込まれたとき，解糖系によって fructose bis-phosphate (FBP)へと変換され，FBP は PTS を構成するタンパク質の一つであるヒスチジン含有タンパク質 (Histidine containing protein: HPr) kinase/phosphatase (HPrK)を活性化する．この HPrK は HPr の Ser-46 のリン酸化を促進する．リン酸化された HPr は，グローバル制御タンパク質で

ある CcpA と複合体を形成し，catabolite responsive elements (*cre*)と呼ばれる特異的な DNA 配列に結合することで 100 を超える遺伝子の発現を制御している．グローバル制御タンパク質は CcpA 以外にも存在し，増殖に関わる遺伝子のみならず，二次代謝物や菌体内外の酵素の発現にまで寄与している．そしてこのカーボンカタボライト制御はグローバル制御タンパク質によってのみ行われているのではなく，培地中の炭素源の種類によっても影響を受けることが報告されている (36)．また，カーボンカタボライト制御は非常に多くの遺伝子の制御に関わっているため, CcpA のみならず CodY や TnrA といったカタボライト制御タンパク質についても，これまでに DNA マイクロアレイを用いた網羅的な発現解析が行われてきている (37–39)．さらに Ogura らは *B. subtilis* において CcpA が DegU という発現制御タンパク質を正に制御していることを明らかにした (40)．この DegU は DegS によってリン酸化されることで活性化し，PGA synthetase をコードする *pgsBCA* オペロンの発現を正に制御している (41)．つまりカーボンカタボライト制御は間接的に PGA の生産に寄与していることが明らかとなったのである．

最近の報告で，Feng らは *B. amyloliquefeciens* を用いて，PGA 生産に不必要であると考えられる遺伝子を欠損させる代謝工学的な取り組みによって，副産物や PGA 分解酵素の遺伝子を欠損させることにより，最終生産量を向上させたことを報告している (42,43). しかしながら, この報告の中でも, 例えば PGA 生産時の *B. amyloliquefeciens* が, 2 つある glutamate 生合成経路のうちどちらを利用しているか未解明であったため, 両方の遺伝子を欠損させてその影響を検討した，といったように虱潰しに可能性のある遺伝子を変異させていく必要があった．つまり，*Bacillus* 属を用いた PGA 生産では未だに細胞内代謝制御機構が不明瞭であり，論理的な生産性の向上が困難であるといった課題があげられる．これは，これまでに Ogura らのように部分的な PGA 生産の制御に関する報告はあっても, PGA 生産時の細胞内代謝状態が依然として未知なため, PGA 生産がどのように制御されているか予測することが困難であることが原因であ

ると考えられる．つまり，カーボンカタボライト制御のように PGA 生産菌は種々の代謝物が細胞内の代謝制御に大きく関わっているため, PGA の生産を制御するためには細胞内全体の代謝状態を把握して戦略を構築する必要があると考えられる．

1.4. メタボロミクス

すべての生物は DNA を転写し mRNA を生成し, mRNA を翻訳することでタンパク質を生成し，タンパク質が細胞内で種々の化学反応を触媒することにより代謝物が生み出されている．従来の研究方法は前述のセントラルドグマのどこかの一因子，例えばある遺伝子やタンパク質に注目し，その分子とほかの分子や表現型との関係性を一対一で研究してきた．そして近代では，遺伝子であればゲノミクス，mRNA であればトランスクリプトミクス，タンパク質であればプロテオミクス，といったように，セントラルドグマの各階層における分子の総体を対象とするオミクスと呼ばれる学問分野が発展してきた (44,45)．これにより，一対一ではなく，総体対一，さらには総体対総体といった具合に，研究対象全体としてのバランスや傾向，特徴を俯瞰的に捉えることができるようになった．そして，これまで未解明であった分子間での相互作用などが明らかとなってきた．メタボロミクスはこの代謝物の総体であるメタボロームを網羅的に研究する学問分野であり，オミクスの中では最も新しい分野である．代謝物はこの遺伝子発現の流れであるセントラルドグマの中でも下流の産物であり，表現型の一部として考えられることから，メタボロームを解析して得られる結果は表現型と高い相関を持つと考えられる．

メタボロミクスが分析対象としている代謝物は他のオミクス研究と異なり，親水性から疎水性，それぞれの化合物が持つ物性が幅広い．そのため目的に応じて分析系を選択する必要がある．主に用いられている分析法は，核磁気共鳴分光分析法 (nuclear magnetic resonance spectroscopy: NMR)，ガスクロマトグラフィー質量分析法 (gas chromatography / mass spectrometry: GC/MS)，液体クロマトグラフィー質量分析法

(liquid chromatography / mass spectrometry)，キャピラリー電気泳動質量分析法 (capillary electrophoresis / mass spectrometry: CE/MS)などである．これらの分析手法を選択，もしくは組み合わせることにより，代謝物の網羅性を高めている．

前項で述べたとおり，*Bacillus* 属の代謝は細胞内代謝物の濃度に依存して制御されている．そのため，メタボローム解析によって測定される代謝物量は，制御タンパク質の活性化に関わり，さらにその制御タンパク質によって引き起こされた代謝状態への影響は再度代謝物へ表れると考えられる．つまり，メタボローム解析は *Bacillus* 属の細胞内の代謝状態を観察する強力な手段になり得るといえる．

1.5. 本研究の目的

Ko と Gross は, 培地中の炭素源が glucose と glycerol では *B. licheniformis* ATCC 9945 の増殖や PGA の生産量，そして分子量が異なることを報告している (33)．Glucose は PTS を介して細胞内に取り込まれるのに対し，glycerol は自然拡散で細胞内へと取り込まれる．PTS はカーボンカタボライト制御の一部としてみなされており，そのため，カーボンカタボライト制御において多くの遺伝子の発現を制御する CcpA の活性が glucose と glycerol では大きく異なることが報告されている (46,47)．さらに glucose と glycerol では培養中の PGA の分子量推移も異なるため (33)，カーボンカタボライト制御は PGA の発酵制御に大きく関与していることが推察される．

前述の通りメタボローム解析は定量的な細胞内代謝物情報を得ることができる分析技術である．カーボンカタボライト制御は細胞内代謝物濃度に依存して変化することから，メタボローム解析から得られた情報は *Bacillus* 属の細胞内で起きている代謝制御を反映していると言え，それはカーボンカタボライト制御が PGA 発酵へ与える影響を考察する大きなヒントとなりうる．つまり発酵性能の異なる細胞をメタボローム解析に供して，得られた代謝物情報から細胞内代謝状態を観測し，そこから PGA 発酵への影響を考察し次の培養条件の検討へフィードバックすることができれば，論

理的かつ効率的に PGA の発酵を制御することが可能になると考える.

そこで, 本研究では, *Bacillus* 属を用いた PGA 発酵生産において重要な要素である, 生産量の向上と培養中の分子量低下の抑制を，以下のワークフローに従って試みた (図 1.4). まず，発酵性能の異なる培地で細胞を培養し，細胞を培地から分離しメタボローム解析に供した．さらに，得られたメタボローム解析結果と，培地中成分の変動から，発酵特性の違いを示す細胞内の代謝状態を予測した．そして，予測された細胞内代謝状態から，目的表現型の達成に必要な戦略を構築し，その戦略にのっとって再度培養することで発酵性能の変化を観測し，本手法の妥当性を評価した．第 1 章では PGA の有用性とその生産における問題点，そして本研究の目的とメタボローム解析がそれを達成するキーテクノロジーのなりうることを述べた．第 2 章では過去の報告を元に glucose と glycerol をそれぞれ含む培地における PGA の生産量の違いに注目し，細胞内代謝物プロファイルから培地中の炭素源の流れを予測し，PGA 生産量の向上を試みた．第 3 章では，それぞれの炭素源における分子量推移の違いに着目し，さらに炭素源の種類を増やすことで PGA の分子量推移へ与える代謝制御機構をメタボローム解析結果から検討した．最後に第 4 章では全体を総括し，今後の展望について言及した.

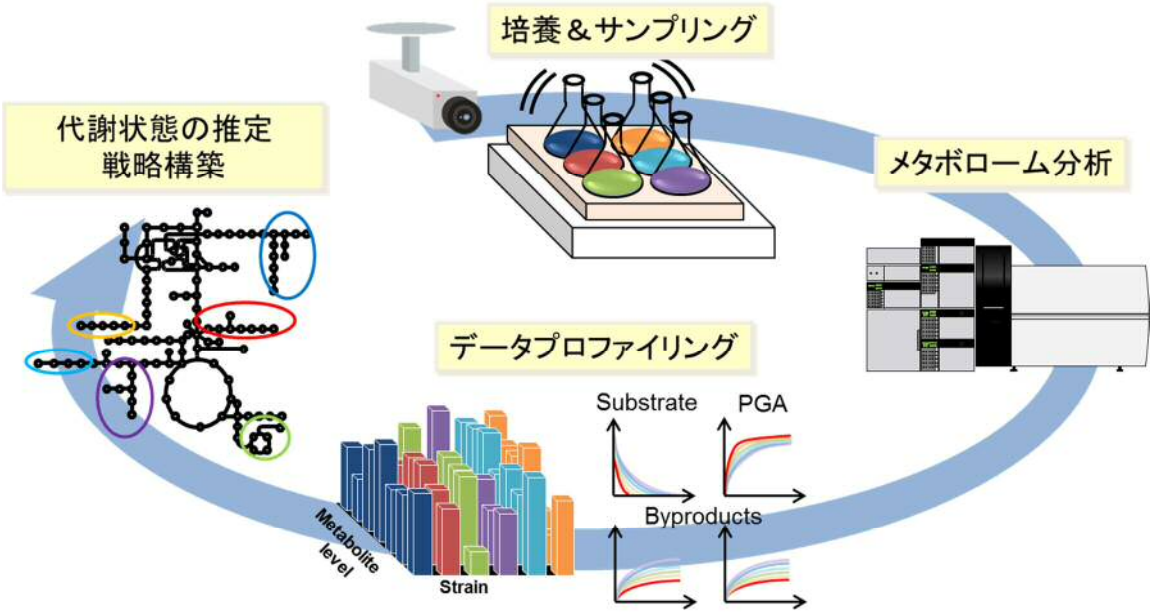

図 **1.4** 本研究のワークフロー

第2章 PGA 生産量の向上に資する *B. licheniformis* ATCC 9945 のメタボローム解析

2.1. 緒言

第 1 章で述べたように Ko と Gross は glucose と glycerol をそれぞれ用いた場合では PGA の生産能が異なることを報告しており (33)，これはカーボンカタボライト制御の PGA 生産に対する関与を示唆するといえる．しかしながらこれまでのカーボンカタボライト制御が PGA の生産にどのように影響しているかを細胞内の代謝制御機構から議論している論文はなく，そのため培地中に含まれる炭素源がどのような経路を経て PGA と変換されているかは未解明な部分が残されている．

そこで本章では Ko と Gross らと同様の培地と菌株を用いて培養し，培地の違いと PGA 生産性の違い, そして種々の炭素源の取り込みを含む培地成分の変化を観測した. そして，それぞれの培地における細胞がどのような代謝状態にいるかをメタボローム解析によって観測し，そこから炭素源の流れを推測した．さらに得られた仮説を元に培養戦略を構築し PGA 生産量の向上を試みた.

本研究で用いた *B. licheniformis* ATCC 9945 は最も古くから PGA 生産に関する研究で用いられている菌株であり (48) (当時は *B. subtilis* として報告されていた)，比較的大量かつ高分子の PGA を生産することが知られている．また，カーボンカタボライト制御に寄与する代謝物，そしてその支配下にある代謝経路は多岐にわたり，幅広い化合物群を研究する必要がある．そこで本研究では ion-pair LC/MS/MS を用いたメタボローム解析を行った．本手法は ion-pair 試薬と呼ばれる両親媒性を持つ化合物を移動相中に溶解させ固定層に逆相系のカラムを用いることで糖リン酸，有機酸，アミノ酸，核酸などの中央代謝における主要代謝物をクロマトグラフィー部分にて分離させ，さらに化合物特異的なプロダクトイオンを検出する MS/MS 分析を行うことで，幅広い細胞内代謝物を一斉に検出することができる.

2.2. 実験方法

2.2.1. 試薬

L-Glutamic acid，citric acid，di-ammonium hydrogen citrate，glycerol，NH_4Cl，K_2HPO_4，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$，$FeCl_3 \cdot 6H_2O$，$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ は Carl Roth GmbH + Co. KG. (Karlsruhe, Germany)，LC/MS-grade ultra-pure water，HPLC-grade chloroform，acetic acid，perchloric acid, H_2SO_4, $NaNO_3$, NH_4HCO_3, $MnSO_4 \cdot H_2O$, ribitol は和光純薬株式会社 (Osaka, Japan), D-glucose と NaOH はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan), 10-camphorsulfonic acid, 2,3-butanediol，tributylamine は Sigma Aldrich (MO, USA)，acetoin は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan)からそれぞれ購入した.

2.2.2. 菌株と培養方法

Bacillus licheniformis ATCC 9945 は American Type Culture Collection (ATCC) (VA, USA)から壌土していただいた．菌体を 2%の寒天で固化した E 培地(L-glutamic acid, 20.0; citric acid, 12.0; glycerol, 80.0; NH_4Cl, 7.0; K_2HPO_4, 0.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.04; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.15; and $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.104 (g/L)) (49)で 37°C，48 時間静置培養し，粘性の高いコロニーを選抜し，500 mL フラスコ中へ 100 mL 分注した E 培地で 37°C，振盪直径 5 cm，250 rpm で 24 時間培養 (Bio-Shaker BR-3000LF, TAITEC, Saitama, Japan)した (33)．得られた培養液は等量の 20% glycerol 溶液と混合し-80°C で保存し，以後の実験に用いた.

本実験では，E 培地の glycerol が同量の glucose に置き換えられたものを用いた (表 2.1)．それぞれの培地の pH は NaOH で 7.4 になるように調整した．20 分，121°C でオートクレーブした後，37°C で 30 分間解凍した菌体を 1 L に対して 4 mL 植菌した．植菌された培地のうち 100 mL を 500 mL の三角フラスコへ分注し，37°C，振盪直径 5 cm，250 rpm で 96 時間培養した．すべての実験は反復数 3 で行い，示しているデー

タはその平均と標準偏差である.

表 2.1 各培地に含まれる炭素源の組成

Medium	Carbon source components and concentrations (g/L)			
	Glucose	Glycerol	L-Glutamic acid	Citric acid
E	0.0	80.0	20.0	12.0
P	80.0	0.0	20.0	12.0
EC	0.0	80.0	20.0	18.0
PC	80.0	0.0	20.0	18.0

また，2.3.4.で行った断続的添加培養実験においては，240 g/L の citric acid，もしくは 282.55 g/L の di-ammonium hydrogen citrate を 12 時間毎に培養時間 24-48 時間まで，毎回 5 mL ずつ添加した．本溶液の pH は NaOH を用いて，PGA 生産時の pH に近い 6 に調整した．増殖の確認のために，培養液を一部分注し，光学的密度 (optical density; OD)が波長 600 nm にて 0.3 未満になるように希釈し，12 時間ごとに計測した．OD の測定には GeneQuant 100 spectrophotometer (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK)を用いた.

2.2.3. 培地成分の分析

2.2.3.1. PGA の分析

培養液中の PGA 分析のため，培養液の一部を分注し，HPLC グレード蒸留水にて 10 倍希釈した後, 16,000 ×*g*, 4ºC にて 20 分間遠心分離した. その後上清を Mini-Uni prep PTFE filter (pore size 0.45 μm, GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK)を用いてろ過し，Shodex OHpak SB-G guard column (6.0 × 50 mm, Showa Denko KK,Tokyo, Japan)をガードカラムとし，Shodex OHpak SB-806M HQ (8.0 × 300 mm, Showa Denko KK, Tokyo, Japan)を用いてサイズ排除クロマトグラフィー (size exclusion chromatography; SEC)にて分析した. 本分析はカラムオーブンである GL-7432 を装着した GL-7400 (GL Science,

Tokyo, Japan)を用いて行った．移動相は 50 mM $NaNO_3$ で，流速は 1.0 mL/min に設定した．カラムオーブンの温度は 60ºC で,10 μL を分析に供した．定量用の検量線を作成するのに用いた PGA は Goto らの方法を参考にして培養液から精製した (29).

2.2.3.2. 糖，citrate，acetate，2,3-butanediol，acetoin の分析

PGA の分析と同様のサンプルと HPLC を本分析にも使用した．本分析では Aminex HPX-87H column (7.8 × 300 mm, Bio-RAD, CA, USA)を使用し，移動相は 5 mM H_2SO_4, 流速は 0.6 mL/min，カラムオーブンの温度は 65ºC で行われ，10 μL のサンプルを分析に供した．それぞれの化合物の検量線は標品を用いて 3 点で構築した.

2.2.3.3. Glutamate，ammonium の分析

培養液中の glutamate と ammonium はそれぞれ，Yamasa L-Glu Assay Kit (Yamasa Shoyu Co. Ltd., Chiba, Japan)と EnzyChrom ammonia/ammonium kit (BioAssay Systems, CA, USA)を用いた酵素法にて測定した.

2.2.4. メタボローム解析

2.2.4.1. サンプル調製

メタボローム解析用のサンプルは Nakayama らと Li らの方法を応用して調製した (50,51)．OD_{600} を分析し，以下の式に適当な容量の培養液を回収した.

$$\text{Sampling volume (mL)} \times OD_{600} = 3$$

その後，粘性を低下させるために同量の 0.25 M perchloric acid と混ぜあわせた後，10 秒間ボルテックスにて撹拌した．混合液を 25 mm GD/X PVDF syringe filter (pore size 0.45 μm, GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK)を装着したシリンジに移し，ろ過した．菌体の含まれるフィルターを回収液量の 4 倍の容量の 300 mM NH_4HCO_3 で洗浄したのち，液体窒素で瞬時に凍結した．その後凍結乾燥 (VD-800F, TAITEC, Tokyo,

Japan)を行い，抽出まで-80ºC で保存した．

細胞内代謝物を抽出するため，0.7nM 10-camphorsulfonic acid (LC/MS/MS 分析の内部標準物質)を含む 1.5 mL の 80% methanol を，凍結乾燥後の菌体を含むフィルターでろ過し，ろ液を再度同様のフィルターでろ過する操作を 5 回繰り返した．その後 750 μL のろ液へ 225 μL の超純水，150 μL の methanol，750 μL の chloroform を添加しボルテックスにて撹拌した後，16,000 ×*g*，4ºC にて 3 分間遠心分離を行った．これにより二層へ分離した溶液の水相である上層を 350 μL 回収し，新しい 1.5 mL サンプルチューブへ分注した．その後，遠心濃縮，凍結乾燥を行い，LC/MS/MS 分析まで-80ºC にて保存した．この時余ったすべてのサンプルの上清を回収し混合液を調製し，これを分析評価用試料 (quality control; QC)とした．350 μL の QC についても同様の操作で凍結乾燥まで行い保存した．

2.2.4.2. Ion-pair-LC/MS/MS 分析

凍結乾燥したサンプルを 50 μL の超純水で再溶解し，ガラスバイアルへ移し，Ion-pair-LC/MS/MS 分析へ供した．本分析は Shimadzu Nexera UHPLC system をクロマトグラフィーとして装着した LCMS 8030 Plus device (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)を用いて行った. カラムは PE capped CERI L-column 2 ODS (2.1 mm × 150 mm, particle size 3 μm, Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo, Japan)，移動相は 15 mM の酢酸を含む 10 mM tributylamine 水溶液を A とし，methanol を B として，流速 0.2 mL/min, カラムオーブン温度は 45ºC にて 3 μL のサンプルを表 2.2 に示したグラジエント条件で分析に供した. 質量分析計の条件は以下のとおりである: desolvation line temperature, 250ºC; drying gas flow, 15 L/min; heat block temperature, 400ºC; nebulized gas flow, 2 L/min.

表 2.2 グラジエント条件

Time (min)	%A	%B
0.0	100	0
1.0	100	0
1.5	85	15
3.0	85	15
8.0	50	50
10.0	0	100
11.5	0	100
11.5	100	0
20.0	100	0

2.2.4.3. データ解析

MRMPROBS ver.2.11 (52)を自動ピーク同定，及びピークエリア値の算出に用いた．選択されたピークのエリア値は同じサンプルの内部標準物質のエリア値で除算された後，QC の値に基づく LOWESS にて標準化された (53).

主成分分析 (principal component analysis: PCA)と *t* 検定はそれぞれ SIMCA 13 (UMETRICS, Umeå, Sweden)と AIoutput ver. 1. 29 (54)を用いて行った．

2.3. 結果と考察

2.3.1. 菌体の増殖と培養液中成分の経時変化

glycerol もしくは glucose を含む培地で菌体を培養した結果を図 2.1 に示す.

まず，増殖については glucose 培地のほうが PGA の生産期においても増殖を続けており，高い OD_{600} 値に達していることがわかる (図 2.1A 左). 反対に glycerol 培地で培養した菌体のほうが OD_{600} 値は低いものの，96 時間後の PGA 生産量は 35.82 g/L であり，glucose 培地における 19.21 g/L の生産量より高い値を示した (図 2.1A 右). 本結果は, 先行研究として同様の実験を行った Ko と Gross の結果と同様であると言え，glycerol と glucose, それぞれの炭素源が *B. licheniformis* ATCC 9945 の PGA 生産量の違い確認することができた (33).

それぞれの培地において，glucose は glycerol に比べ早く消費されていることがわか

る (図 2.1B 左). 一方で citrate は glycerol 培地で早く消費されている (図 2.1B 中). 多くの微生物で glucose はカーボンカタボライト制御を引き起こす代表的な化合物として知られており，これにより glucose トランスポーターの発現が促進されるとともに，glucose 以外の炭素源のトランスポーターの発現が抑制されることが報告されている (55,56). *Bacillus* 属においても glucose が glycerol と citrate のトランスポーターの発現を抑制することが報告されており，本結果と一致する (57).

Bacillus 属は PGA の生産中に acetate，acetoin，2,3-butanediol を副産物として生産する (58). Glucose 培地では PGA の生産期において，acetoin と 2,3-butanediol をより多く生産していた (図 2.1C). 一方，glycerol 培地では acetate が蓄積していた．Moreno らは acetoin 生合成に関わる遺伝子をコードする *alsSD* の発現には，CcpA と glucose の両者が必要であることを報告しており (36)，glycerol 培地では acetoin が蓄積せず，glucose 培地で蓄積したという本結果と一致する．また，2,3-butanediol は解糖系で生産された NADH を acetoin の還元反応に利用することで生産されることが知られており (59)，glycerol 培地に比べ glucose 培地で 2,3-butanediol がより多く生産されていたのも，カーボンカタボライト制御によって活性化した acetoin 生合成に派生した結果であると考えられる．さらに，acetate kinase という acetate を acetyl-CoA へ変換する反応を触媒する酵素をコードする *ackA* も同様に CcpA と glucose の両方が必要であることが報告されており (60)，これにより glucose 培地では acetate が acetyl-CoA へと変換されていったと考えられる．そのため，glycerol 培地に比べて glucose 培地では acetate の蓄積が低かったと考えられる．

以上の結果から，先行研究で報告されているカーボンカタボライト制御の影響がそれぞれの培地で顕著に現れていたことが改めて示されていたと言える．このことからそれぞれの培地ではカーボンカタボライト制御によって異なる代謝制御が行われており，それが PGA 生産に関与している可能性が示された．

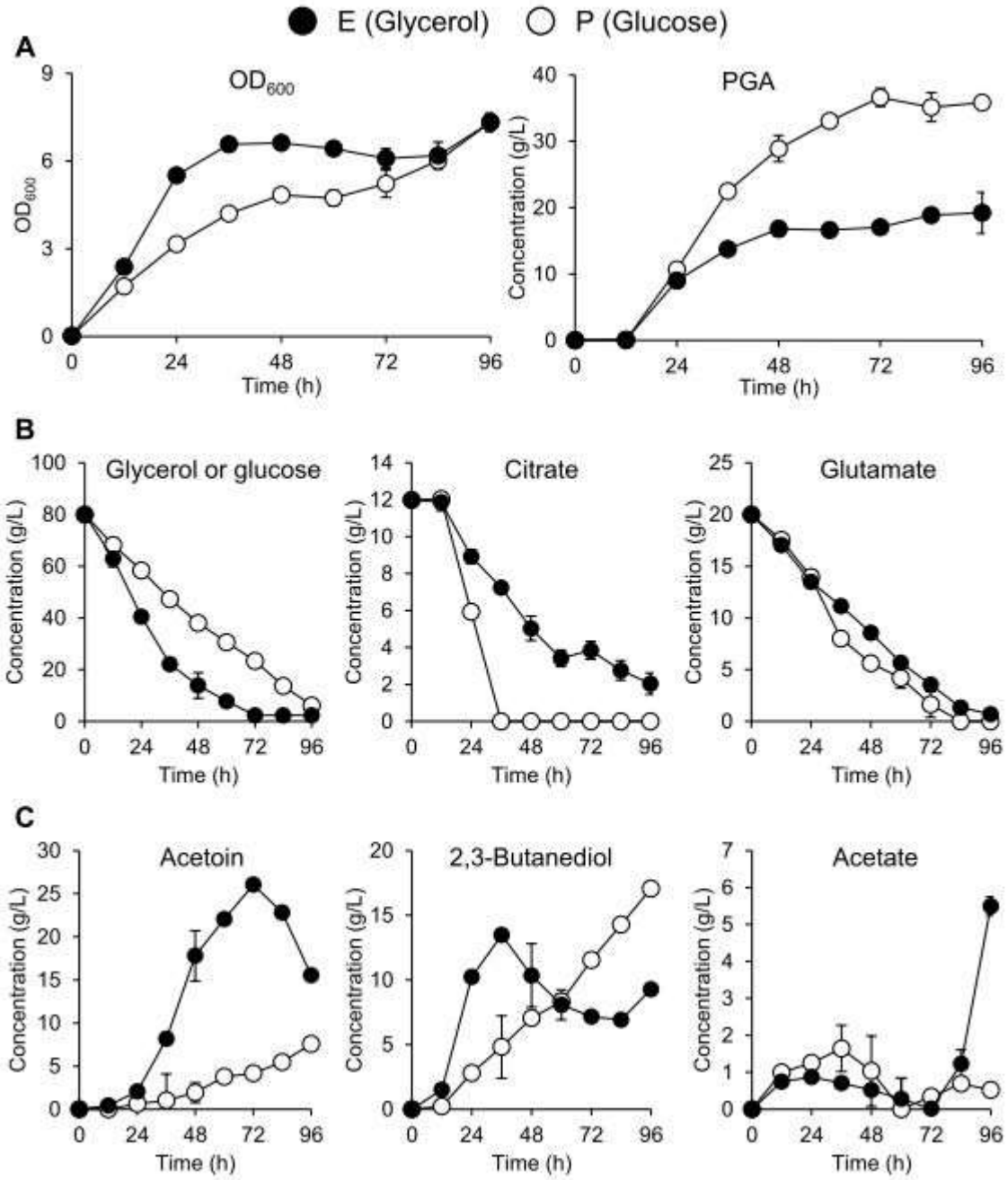

図 **2.1** 培地成分の経時変化．黒丸は **E** 培地 **(glycerol)**の結果を表し，白丸は **P** 培地 **(glucose)** の結果を表す．**A** において左は **OD_{600}** 値を表し，右は **PGA** の生産量を表す．**B** において左は **glycerol** もしくは **glucose** の濃度を表し，中は **citrate** の濃度，そして右は **glutamate** の濃度を表す．**C** において左は **acetoin** の濃度を表し，中は **2,3-butanediol** の濃度，そして右は **acetate** の濃度を表す．すべての結果は反復数 **3** で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す．

2.3.2. メタボローム解析結果

Ion-pair-LC/MS/MS 分析によって解糖系，ペントースリン酸経路，TCA 回路，アミ

ノ酸及び核酸生合成に関連する 63 の代謝物が検出された (付録，表 S1 参照). それぞれの培地において特徴的な代謝物を解析するために，培養 24 時間から 60 時間のメタボロームデータを PCA に供した (図 2.2).

PCA は教師なしの探索型データ解析手法の一つである．データの持つ説明 (独立) 変数にもとづいて，各データの分散を最大化する第一主成分軸 (First principal component: PC1)を算出し，それと直行し残差の分散を最大化する PC2，そしてさらに PC2 に直行する PC3 というように主成分軸を算出し, それを組み合わせて視覚化する手法であり，メタボロームデータのようにサンプル数×代謝物数という膨大な情報を持つデータマトリクスを客観的に評価する際に有用な手法として汎用されている．本解析手法では各サンプルを主成分軸へ投影した際に得られるスコア値と，主成分軸の構成に各説明変数がどれだけ寄与したかを表すコーディング値が得られる．つまり特定の主成分軸に沿って各サンプルが分離している場合，その主成分軸のローディング値で正負のそれぞれにおいて高い値を示した化合物がサンプルの分離に強く寄与しているといえる．

まず，それぞれのサンプルのスコア値を元にプロットされたスコアプロットでは，培養時間ごとに第一主成分 (First principal component: PC1) 方向で分離し, 培地の違いにしたがって PC2 方向で分離していた (図 2.2A). つまりこの結果から，本実験によって得られたメタボロームデータのうち，PC2 の方向の分離に寄与していた化合物はそれぞれの培地における代謝状態の違いを強く反映していると考えられる．そこで，PC2 において，正と負でそれぞれ高いローディング値を示した化合物を図 2.2B に示した．まず，glucose と glycerol をそれぞれ炭素源として用いたため，それぞれの培地において，菌体が取り込む際に最初にリン酸化されて生じる化合物である glucose 6-phosphate (G6P)とα-glycerolphosphate (a-GP)がそれぞれの培地で蓄積していた．また，glucose 培地ではペントースリン酸経路関連の化合物である 6-phosphogluconate (6PGA)，fructose 6-phosphate (F6P)，sedoheptulose 7-phosphate (S7P)，ribose 5-phosphate

(R5P)，ribulose 5-phosphate (Ru5P)が蓄積していた．ペントースリン酸経路は増殖に必要な還元力である NADPH を生産する重要な経路として知られている. つまり glucose 培地の菌体は glycerol 培地の菌体よりも，よりペントースリン酸経路が活性化しており，結果として良好な増殖を示したと考えられる．一方で，glycerol 培地では解糖系の中間代謝物である phosphoenolpyruvate (PEP)，fructose bis-phosphate (FBP)，bis-phosphoglycerate (BPG)が蓄積していた．glucose は細胞に取り込まれるとき，PTS によって PEP のリン酸基が転移され G6P となるが，glycerol は拡散にしたがって取り込まれ，ATP のリン酸基が転移され a-GP となる．つまり，glucose 培地ではより PEP が glucose のリン酸化に消費されており，glycerol 培地での PEP の蓄積が生じていると考えられる．また，ペントースリン酸経路は NADPH の生産だけでなく，核酸の形成に必要なリボースを生合成するのに利用される代謝経路であり，glycerol を炭素源として増殖するには，糖新生によって G6P を生合成し，ペントースリン酸経路を介して代謝しなければならない．Voigt らは *B. licheniformis* ATCC 14580 をグルコース飢餓状態においた場合，糖新生に関わる遺伝子のうち，pyruvate を PEP へ変換するのに必要な phosphoenolpyruvate carboxykinase をコードする *pckA* と BPG を glyceraldehyde 3-phosphate へ変換するのに必要な glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase をコードする *gapB* の発現が促進されるのに対して，FBP を F6P へ変換するのに必要な fructose bisphospatase (FBPase)をコードする *fbp* の発現は変化しなせず，低い発現量にとどまることを報告している (61)．FBPase は解糖系の F6P から FBP を生成する反応とは独立に働く酵素であるため, 糖新生においてペントースリン酸経路に必要な G6P を生合成するためには FBPase の発現が必須となる. つまりこの FBPase の発現量が低いことにより，glycerol 培地では FBP を F6P へ変換する反応がボトルネックとなり，FBP 以降の BPG を含む解糖系関連代謝が蓄積していると考えられる.

また glucose 培地で培養した細胞内では， GTP，isoleucine，valine と，TCA 回路の中間体である citrate と 2-oxoglutarate が蓄積していた．GTP，isoleucine，valine はカタ

ボライト制御タンパク質の一つである CodY の活性化因子として知られる (62,63). CodY は citrate を isocitrate への反応を触媒する aconitase をコードする *citB* と，2-oxoglutarate から glutamate への反応を触媒する glutamate synthase (GOGAT)をコードする *gltAB* の発現を阻害することが明らかとなっている (37). *Bacillus* 属は GOGAT 以外に glutamate dehydrogenase (GDH)によって触媒される glutamate 生合成経路を持つ. しかしながら GDH の発現は glutamate によって抑制されることが知られており, 本研究で用いた培地には大量の glutamate が含まれている．つまり glucose 培地では CodY が活性化していることにより，aconitase や GOGAT の発現が抑制され，citrate や 2OG を glutamate へと変換できないため，PGA の生産が低下していると考えられる.

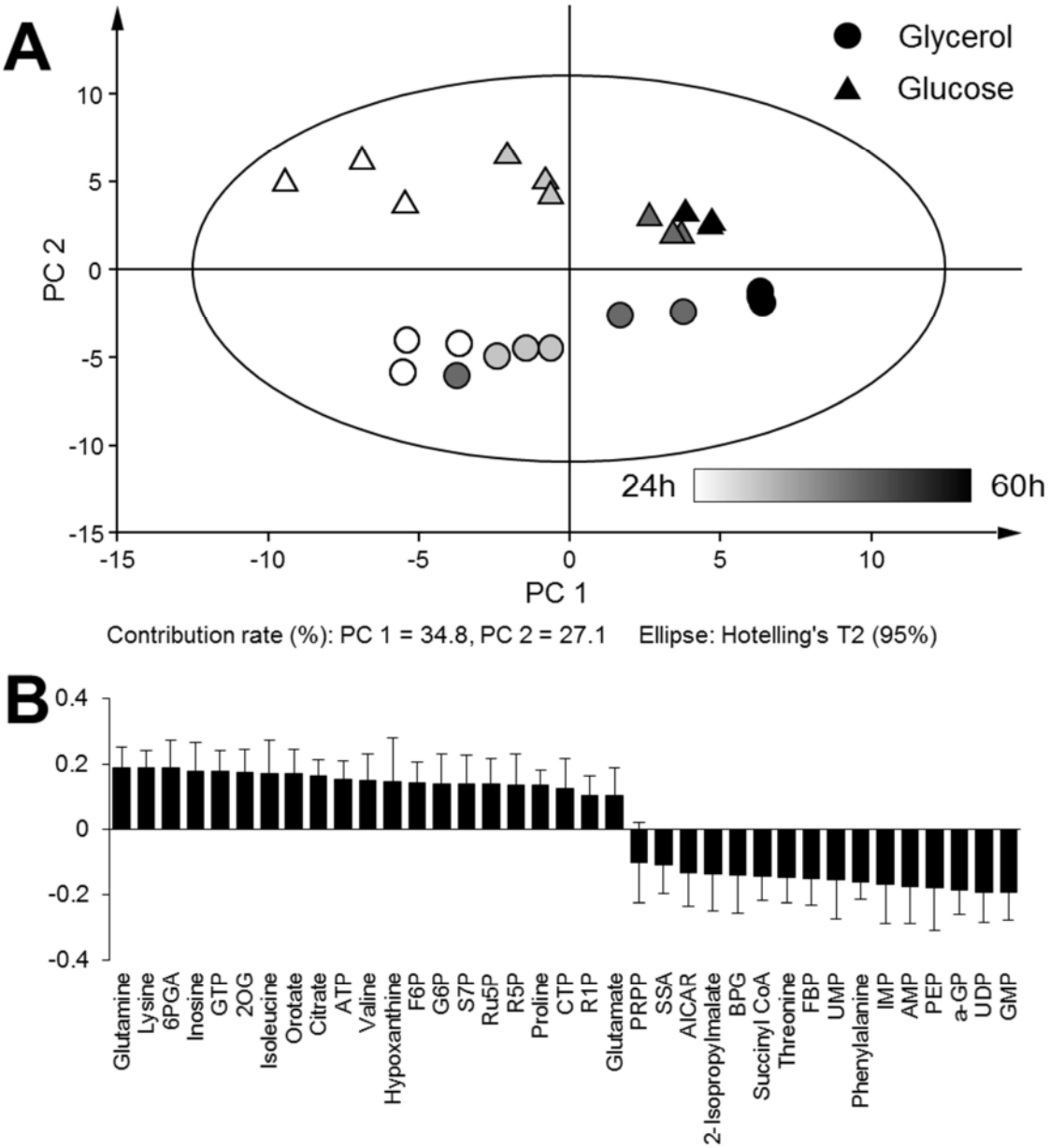

図 **2.2** メタボロームデータを用いた**PCA**結果**. A**はスコアプロットを示しており**,** 丸は**glycerol**の結果を表し，三角は**glucose**の結果を表す．また**24** 時間から**60** 時間までの結果は白から黒にかけてのグラデーションで表す．**B** には **PC2** においてローディング値が正負のそれぞれで**0.1** を超えた化合物を示した．すべての結果は反復数 **3** で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す．**6PGA, 6-phosphogluconate;2OG, 2-oxoglutarate; F6P, fructose 6- phosphate; G6P, glucose 6-phosphate; S7P, sedoheptulose 7-phosphate; Ru5P, ribulose 5-phosphate; R5P, ribulose 5-phosphate; R1P, ribulose 1-phosphate; PRPP, phosphoribosyl pyrophosphate; SSA, succinic semialdehyde; AICAR, 5-aminoimidazole-4-carboxiamide ribonucleotide; BPG, bisphosphoglycerate; FBP, fructose bisphosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; a-GP, α-glycerol phosphate.**

図 2.3 にそれぞれの培地において特徴的であった代謝物をまとめた．まず glucose 培地では，CodY の活性化と glucose の添加によって citrate を glutamate へ変換することができないため PGA 生産が抑制されていると示唆された．一方 glycerol 培地では FBP の蓄積により CcpA が活性化して培地中の citrate を glutamate へ変換し，大量の PGA が生産された示唆された．つまり PGA 生産時に *B. licheniformis* ATCC 9945 は glycerol や glucose を細胞形成のための炭素源として利用しており，PGA の生産には citrate が主な炭素源として利用されていることが示唆された．

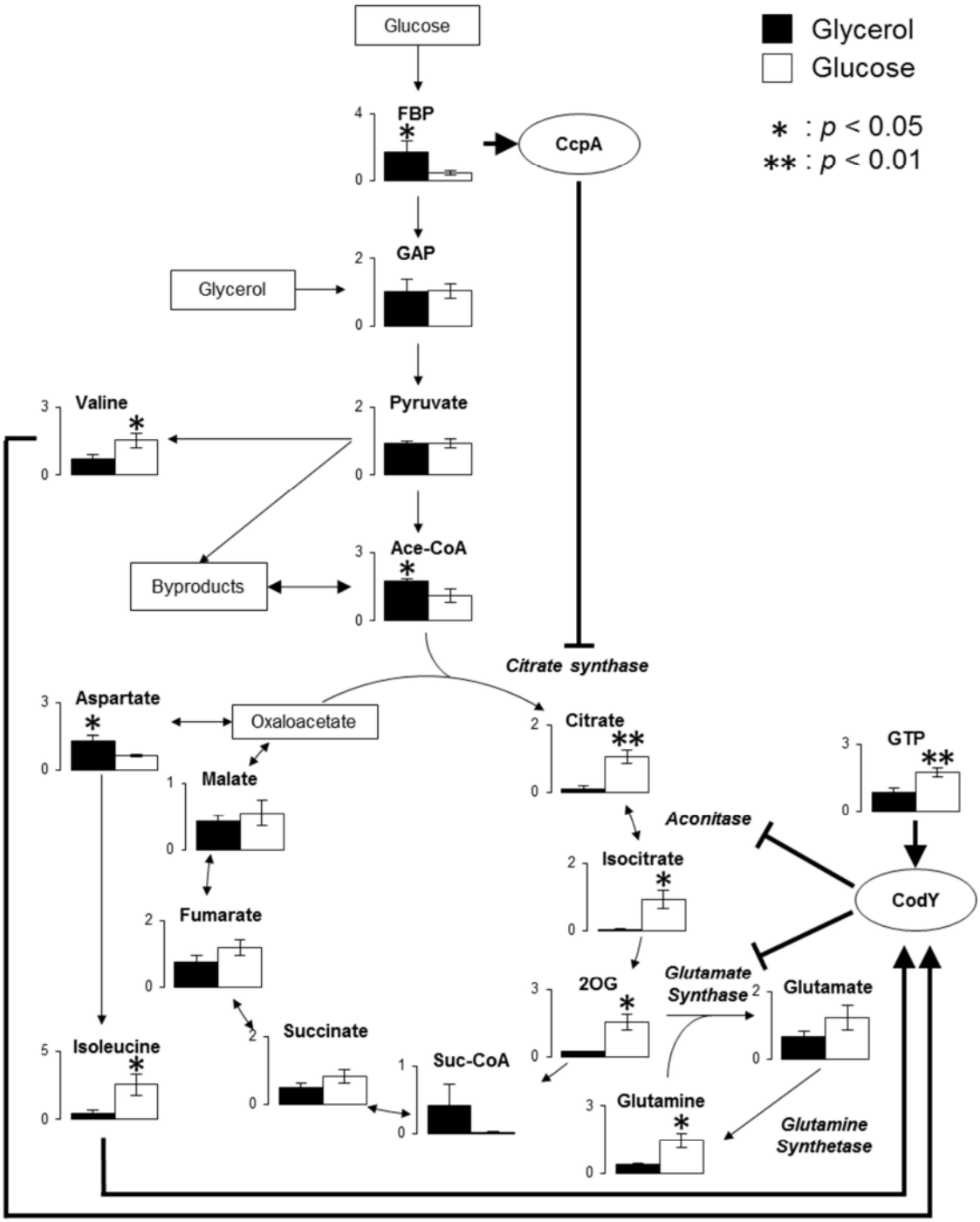

図 **2.3** メタボローム解析結果．黒は **glycerol** を表し，白は **glucose** を表す．縦軸は **LOWESS** によって標準化されたピーク強度を示す．**2** 群間で定量値に優位な差があった場合アスタリスクで示す **(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)**．細い矢印は代謝の流れを表し，太い矢印と **T** 字のバーはそれぞれ活性化と抑制を表している．すべての結果は反復数 **3** で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す．**FBP, fructose bisphosphate; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; Ace-CoA, acetyl-CoA; 2OG, 2-oxoglutarate; Suc-CoA, succinyl-CoA.**

2.3.3. PGA 生産量の向上を目指した Citrate 添加培養

メタボローム解析によって citrate を主な基質として PGA が合成されていることが示唆された．また，図 2.1 に示したように，高い PGA 生産量を示した glycerol 培地において citrate は 36 時間で枯渇し，その時 PGA の生産は停止していた．そこで citrate をそれぞれの培地へ添加することで PGA の生産量が増加するか検討した．用いた培地は表 2.1 に示した通りである．

図 2.4A にその培養結果を示す．Citrate 添加 glycerol 培地において citrate は 48 時間で枯渇し, 96 時間で非添加培地よりも高い 45.73 g/L の PGA を生産した. 一方で, citrate の添加は glycerol 培地において PGA の生産量を向上させただけでなく, ammonium と glutamate の消費が促進されていた (図 2.4B,C). 図 2.3 のメタボローム解析の結果でも示されている通り，glucose 培地で培養した場合，細胞内では glutamine が蓄積していた．2.2.2.にも記述したとおり，培地中に含まれる glutamate によって GDH の発現が抑制されているため (64)，細胞内で glutamate は GOGAT によって生合成されていると考えられる. GOGAT はそれぞれ 1 分子の glutamine と 2OG から 2 分子の glutamate を生合成する反応を触媒する．そのため glutamate の生合成に glutamine が必要となるので，glutamate と ammonium から glutamine を合成する反応を触媒する glutamine synthetase (GS)が GOGAT と同時に発現する. つまり本研究で用いた培地において細胞は GOGAT/GS 経路によって citrate から合成された 2OG と glutamine から glutamate を合成し，その glutamate から glutamine が合成され，また 2OG と共に glutamate が合成されていると考えられる．これが，citrate が主な PGA の基質として利用されていることと，培地中の glutamate は直接 PGA の基質となるのではなく，培地中の ammonium を，GS を介して 2OG から glutamate を生合成するために必要なアミノ基のドナーとして利用されるため，glucose と glycerol 培地で glutamate の消費に PGA の生産量の顕著な違いほどの差がみられないことの理由であると考えられる．このとき glucose 培地では GOGAT の発現が CodY の活性化によって抑制されていると考えられるため，

細胞内の glutamine を glutamate へ変換できない. さらに glutamine は GS の活性をアロステリックに阻害することが知られており (65), これにより GS の活性が低下すると考えられる. 培地中の ammonium の消費を比較すると glucose 培地は glycerol 培地よりも多くの ammonium が残存しており, これは glutamine の蓄積による GS の活性の低下することで ammonium の取り込みが抑制された結果と考えられる.

以上より, 本研究によって, *B. licheniformis* ATCC 9945 は glutamate 生合成に GOGAT/GS 経路を利用しており, そのため培地中の glutamate を直接 PGA 生産に使うのではなく, citrate から合成される 2OG と ammonium を基質として PGA を合成しているということが強く示唆された.

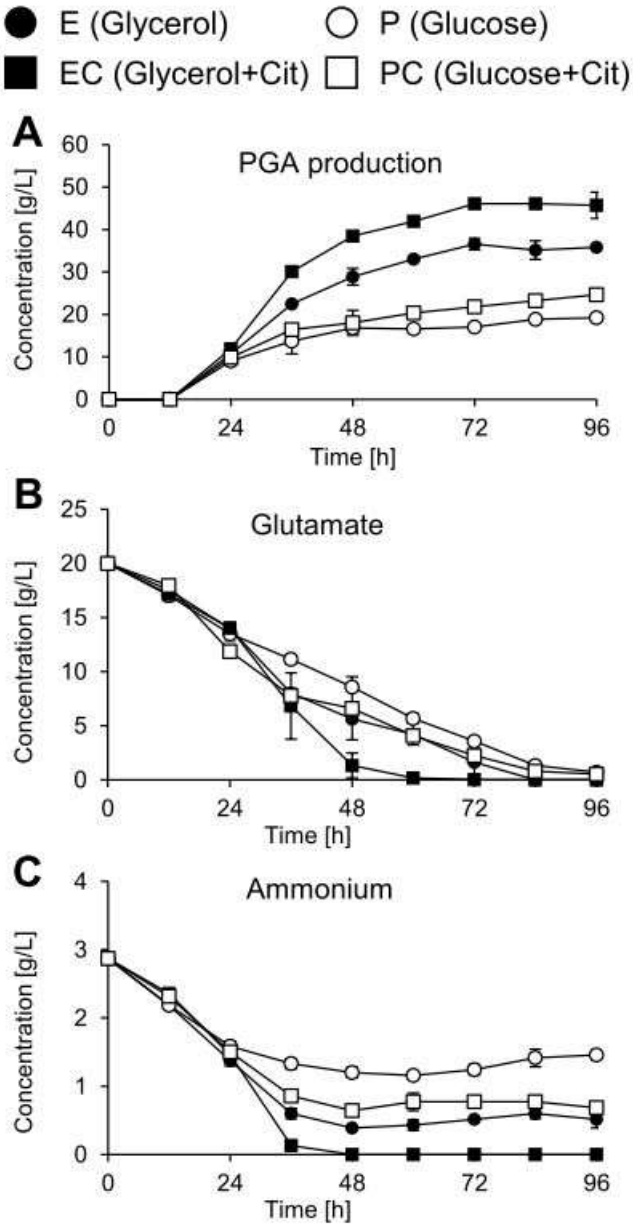

図 2.4 Citrate 添加実験結果．黒丸は citrate 非添加 glycerol 培地，白丸は citrate 非添加 glucose 培地，黒四角は citrate 非添加 glycerol 培地，白四角は citrate 非添加 glucose 培地を表す．A は PGA 濃度，B は glutamate 濃度，C は ammonium 濃度を示している．すべての結果は反復数 3 で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す.

2.3.4. 断続的 citrate 及び ammonium 添加による更なる PGA 生産量の向上

2.3.3.から GOGAT/GS 経路を利用して PGA を生産していることが示唆されたことから，培地成分のうち citrate だけでなく ammonium も PGA の生産に必要であることが考えられる．また，citrate と ammonium は citrate 添加 glycerol 培地において 48 時間で

枯渇していた (図 2.4B,C). そこで，citrate と ammonium のさらなる添加により PGA 生産量の向上を目指した.

本実験では citrate のみの添加，もしくは citrate の ammonium 塩である di-ammonium citrate を用いて行った．培地中の初期イオン強度を高め過ぎると細胞の増殖が遅れることが知られているため，本実験では培養液のイオン強度をある程度保つために断続的な添加実験を行った. 結果を図 2.5 に示す. Di-ammonium citrate の添加により 53.97 g/L の PGA の生産が達成された．これは過去に報告された *B. licheniformis* を用いた PGA 生産量において最も高い値 (35.75 g/L (66))である．さらに図 2.5B には培地中の citrate 濃度と各培養時間までに消費された citrate の合計の値を示した．最終的に消費された citrate は di-ammonium citrate の添加では 38.02 g/L，citrate の添加では 28.83 g/L であった．仮に di-ammonium citrate が添加された培地においてすべての消費された citrate が glutamate へ変換されたとすると理論上は 35.52 g/L の glutamate が合成される．そして培地から消費された glutamate は 20.0 g/L であり，生合成されたものと合計すると 55.52 g/L となる．これは生産された PGA の 53.97 g/L と近い値を示しており，本研究で考察された GOGAT/GS 経路を用いた citrate からの PGA 生合成経路を強く支持する結果であるといえる.

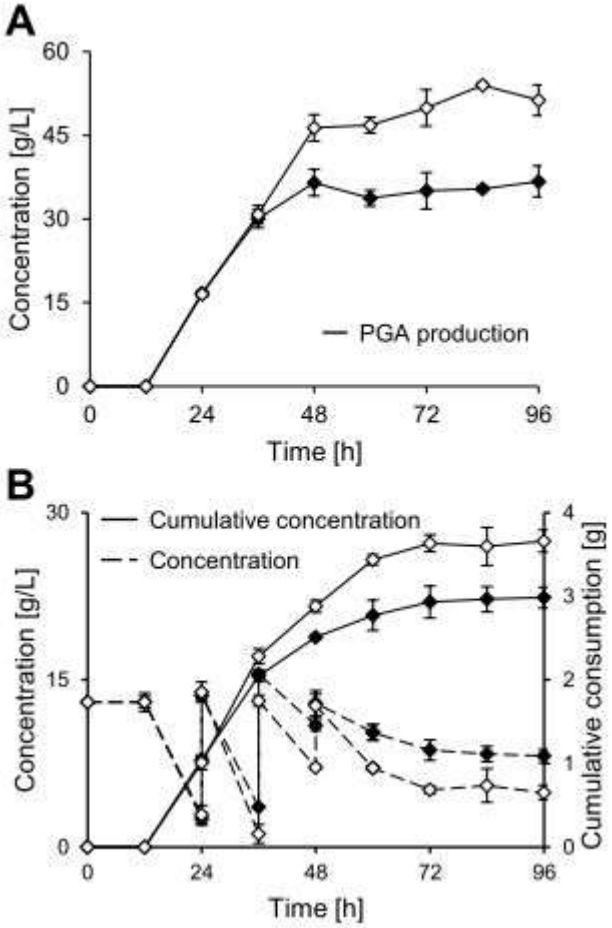

図 2.5 断続的添加実験結果．黒菱型は citrate 添加，白菱型は di-ammonium citrate 添加の結果を表す．A は PGA 濃度を表し，B の実線は各培養時間までの累計 citrate 消費量，破線は倍中の citrate 濃度を表す. すべての結果は反復数 3 で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す.

2.4. 小括

本章では先行研究から glucose と glycerol を用いた場合に PGA の生産量が異なることに着目し，それぞれの培地において細胞内代謝状態をメタボローム解析によって観測し，そこから得られた情報を元に PGA の生産量の向上に取り組んだ.

それぞれの炭素源を含む培地で培養した細胞をメタボローム解析に供し，得られた代謝物データを用いて PCA を行ったところ，それぞれの培地で異なるカタボライト制御タンパク質が活性化していることが示唆された．それぞれの培地における培地成

分と細胞内代謝物量の違いから，PGA 生産時における炭素源の流れを予測し，citrate が PGA の主な炭素源であることを明らかとした. さらに予測された炭素の流れから，citrate と ammonium が PGA の生産に必要であると仮定し，両者を断続的に添加したところ，本菌株のこれまでの報告の中で最も高い生産量を達成することができた.

以上より，PGA の発酵性能の異なる細胞を比較することにより，細胞内代謝状態を予測し，論理的に PGA の生産量を向上させることに成功した．得られた結果はこれまでほとんど注目されていなかったカーボンカタボライト制御が PGA 生産に大きな影響を与えていることを示唆するものであり，今後の PGA 生産に関する研究において重要な知見となるといえる.

第3章 分岐鎖アミノ酸による PGA 分子量低下の抑制

3.1. 緒言

Bacillus 属によって生産された PGA の分子量は，培養時間の経過とともに減少していくことが知られている．PGA の分子量はその物性に大きな影響を与える．特により高分子の PGA は水と混合したときの単位重量あたりの粘性が高く, 1 分子あたりの電子密度が高くなるといった特徴を持つ (67)．しかしながら，生成された PGA の分解方法に関する研究は報告されているが (68,69)，*in vitro* で PGA の伸長反応を行った研究は, *Bacillus* 属の膜画分を用いて行われたもので, その反応効率は非常に低い (25)．つまり *Bacillus* 属によって高分子の PGA を生産するためには，培養中に起きる PGA の分子量の低下を抑制する必要がある．

この分子量の減少は，PGA synthetase による合成系が影響しているかは定かではないが，*Bacillus* 属は培養後期に，*pgdS* にコードされている PGA depolymerase を分泌することが知られている (8)．また， PGA depolymerase 以外にも *ggt* にコードされる γ-glutamyl transferase も PGA の分解能を持つことが報告されている (70)．一方で，Scoffone らは *pgdS* と *ggt* のダブルノックアウト株を用いて培養を行ったが, その際の PGA の分子量は野生株のものよりも低くなってしまっていた (71)．PGA の分子量がどのように制御されているかについては依然として未解明な点が数多く残されており，Scoffone らの結果は，論理的に PGA の分子量低下を抑制することが困難であるということを指示している．

第 2 章の結果から，メタボローム解析結果はカタボライト制御と関わりのある代謝物が特徴的に蓄積していることを明らかにし，細胞内の代謝状態を反映していると示唆された．この観測された代謝状態は，数多くの遺伝子の発現がカタボライト制御タンパク質によって制御された結果であるといえ，異なる表現型を示す細胞内で活性化していると示唆されるカタボライト制御タンパク質は表現型に強い影響を持つ可能性が考えられる．つまり，目的とする表現型を持つ細胞内で活性化していると考えら

れるカタボライト制御タンパク質を，疑似的に活性化することで目的とする表現型を得ることができるのではないかという仮説が考えられた．

本研究において，第 2 章において PGA 生産量の定量で行った SEC の結果でそれぞれの培地で分子量分布が異なることが示された．図 3.1 に 2.3.3.で行った citrate 添加実験における培養 48 時間における各培地の SEC 分析結果を示した．SEC において基本的には分子量の大きい分子の溶出時間は早くなり，小さい分子は遅くなるため，本結果から glycerol 培地では glucose 培地よりも低分子の PGA が多く含まれていることがわかる．これは，それぞれの培地の PGA の分子量が炭素源の影響を受けて大きく異なることを示しており, PGA の分子量もカーボンカタボライト制御によって影響を受けている可能性が考えられる．

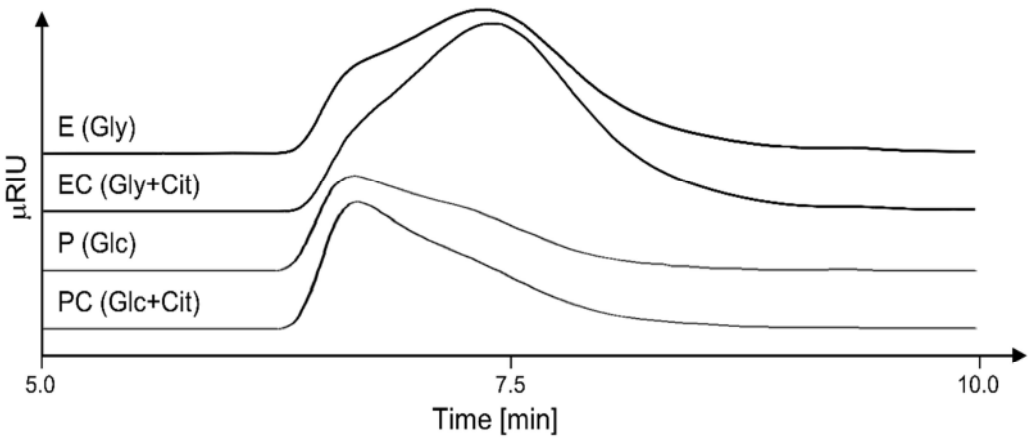

図 3.1 第 2 章における培養 48 時間のサンプルの SEC 結果．縦軸は RI 検出器の検出強度．

そこで本章では，メタボローム解析によって得られる代謝状態から高分子 PGA を含む培地で培養した細胞で活性化しているカタボライト制御タンパク質を予測し，そのカタボライト制御タンパク質の活性化因子を培地へ添加することで PGA 分子量の低下を抑制すること，を目的として研究を行った．Barabote らは本研究で用いている *B. licheniformis* ATCC 9945 が glucose，fructose，sorbitol のそれぞれに対して特異的に働く 3 種類の PTS パーミアーゼファミリーを持つことを報告している (72)．PTS は

第 1 章でも述べたとおりカーボンカタボライト制御の一部としてみなすことができ，糖の種類によっても細胞内代謝制御が変化することが報告されている (46,73)．そこで本章では glucose 以外の単糖の PGA の分子量推移に与える影響を検討するため，glucose，fructose，sorbitol (以下 PTS-sugars と総称する)に加え非 PTS-sugars である glycerol を用いて培養を行った．

3.2. 実験方法

3.2.1. 試薬

本章で使用した試薬は第 2 章で使用したものと同様である. それに加え, D-fructose, L-leucine をナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan)，sorbitol，L-isoleucine，L-valine を Sigma Aldrich (MO, USA)からそれぞれ購入した．

3.2.2. 菌株と培養条件

菌株と培養条件は第 2 章と同様に行った. 分岐アミノ酸 (branched-chain amino acids: BCAAs)の添加実験ではそれぞれの BCAAs を 3 mM の濃度になるように添加した．

3.2.3. 培地成分の分析

培地成分の分析機器，条件は第 2 章と同様である．PGA の分子量はサイズ排除クロマトグラフィーの結果から，EasiVial PEG/PEO (Agilent Technologies, CA, USA)と poly(ethylene oxide)s (粘性平均分子量 5,000,000 と 8,000,000, Sigma Aldrich, MO, USA)の保持時間から作成した検量線を元に算出した．

3.2.4. メタボローム解析

メタボローム解析に用いたサンプリング方法や分析，解析はすべて第 2 章と同様である．データ解析で用いた orthogonal partial least squares-discrimination analysis

(OPLS-DA)は SIMCA 13 (UMETRICS, Umeå, Sweden)を用いて行った.

3.3. 結果と考察

3.3.1. 菌体の増殖と培養液中成分の経時変化

それぞれの培地で培養した結果を図 3.2 に示す．まず，増殖について，すべての培地において培養開始後 48 時間で定常期へ達した (図 3.2A). そして PTS-sugars 培地は glycerol 培地に比べ高い OD_{600} 値を示した．また，培養 96 時間における OD_{600} 値は sorbitol が最も高く，反対に glycerol が最も低い結果となった.

PGA の生産量を比較すると glycerol 培地で 35.78 g/L の PGA が生産されており最も高い値を示し，glucose 培地では 13.79 g/L，fructose 及び sorbitol 培地における生産量は約 7.5 g/L と最も低い値となった (図 3.2B)．citrate は glycerol 培地において培養開始後 36 時間で枯渇しており，PTS-sugars 培地ではその消費は抑制されていた (図 3.2C)．Yamamoto らは citrate transporter をコードする遺伝子の *citST* の発現に CcpA が負に関与することを報告している (57)．第 2 章において glycerol 培地で確認された細胞内の FBP の蓄積は HPrK の活性化を促進するため，glycerol 培地でも CcpA は活性化していると考えられる. 本実験の結果でから citrate の取り込み抑制は PTS-sugars 培地のみで起きていることから，citrate transporter の発現は CcpA だけでなく PTS-sugars が培地中に存在するときに抑制されることが示唆された．そして，第 2 章の結果から citrate は主な PTS の基質であることが示唆され，この citrate の消費が抑制されたことは PTS-sugars 培地における PGA 生産量の低さの一つの原因であると考えられる.

また, それぞれに添加した糖, もしくは糖アルコールの消費は sorbitol が最も低く，ついで glycerol，そして glucose と fructose は類似した結果を示した (図 3.2D).

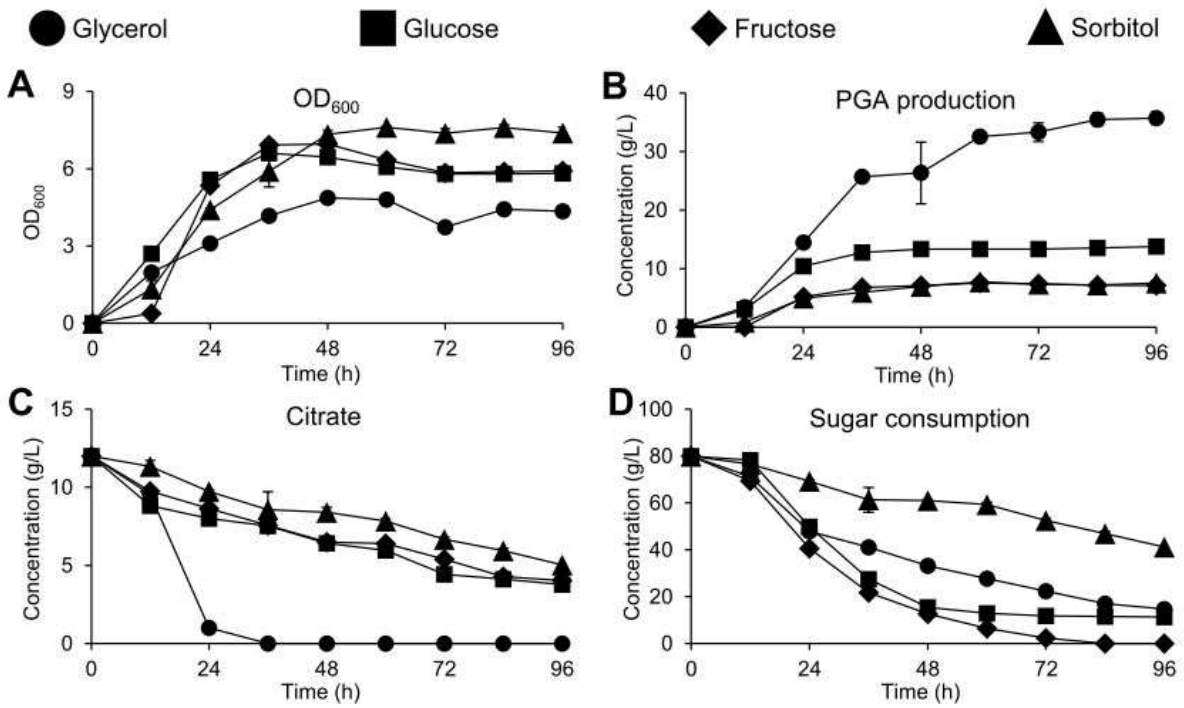

図 3.2 培養液の分析結果．丸は glycerol，四角は glucose，菱型は fructose，三角は sorbitol を表す．A は OD_{600} 値，B は PGA 濃度，C は citrate 濃度，D はそれぞれの糖成分の濃度を示している．すべての結果は反復数 3 で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す．

それぞれの培地における副産物 (acetoin，2,3-butanediol，acetate)の結果を図 3.3 に示す．Glucose 及び fructose 培地では，acetoin が顕著に蓄積しており，2,3-butanediol は培養 36 時間まで蓄積していたが，それ以降は減少したという類似した結果が得られた．一方で培養 60 時間以降では glucose 培地ではそれぞれの副産物の変化が停止しているのに対し，fructose 培地では 96 時間まで継続していた．それぞれの糖の消費を確認すると glucose は培養 60 時間以降，培地中濃度が変化していないのに対し，fructose 培地では 84 時間に枯渇するまで減少を続けていた (図 3.2D)．2.3.1.でも述べたように acetoin 生合成関連遺伝子の発現には glucose と CcpA が必須であることが報告されている (36)．また，fructose も glucose と同様の結果を示したことから acetoin 生合成経路関連遺伝子の発現に同様の効果を持つと考えられる．つまり，60 時間以降に観測された glucose 消費の停止が，acetoin 生合成経路の発現を glucose 培地で培養した細胞内で抑制し，acetoin 及び，acetoin から合成される 2,3-butanediol の傾向が glucose 培地

と fructose 培地で異なる原因であると考えられた.

Sorbitol 培地では acetoin と 2,3-butanediol はほとんど生産されておらず, acetate が培養後期に顕著に蓄積していた. Sorbitol 培地では sorbitol の消費がほかの糖よりも低かったのに対し，最終的な OD_{600} 値が最も高かった. Sorbitol 培地における Acetate の蓄積は培養後期に増加したものであり, 細胞が定常期に達した 48 時間では glucose 培地や fructose 培地における acetoin や 2,3-butanediol の生産量に比べ非常に低い生産量であった. つまり，sorbitol 培地で培養した細胞は glucose 培地や fructose 培地で培養した場合に比べ，取り込んだ sorbitol を効率的に細胞の増殖に利用したと考えられる.

Glycerol 培地では 2,3-butanedeol のみが蓄積していた. 2,3-Butanediol は acetoin を, NADH によって還元することで生成される. 第 2 章の結果から, glycerol 培地では citrate が glutamate へ変換され，PGA が生産されていると示唆された. この場合，citrate から 2OG を生成する過程において NAD^+ が必要となる. つまり，glycerol 培地における 2,3-butanediol の蓄積は，解糖系で生成された NADH を再酸化するために引き起こされたものであると考えられた.

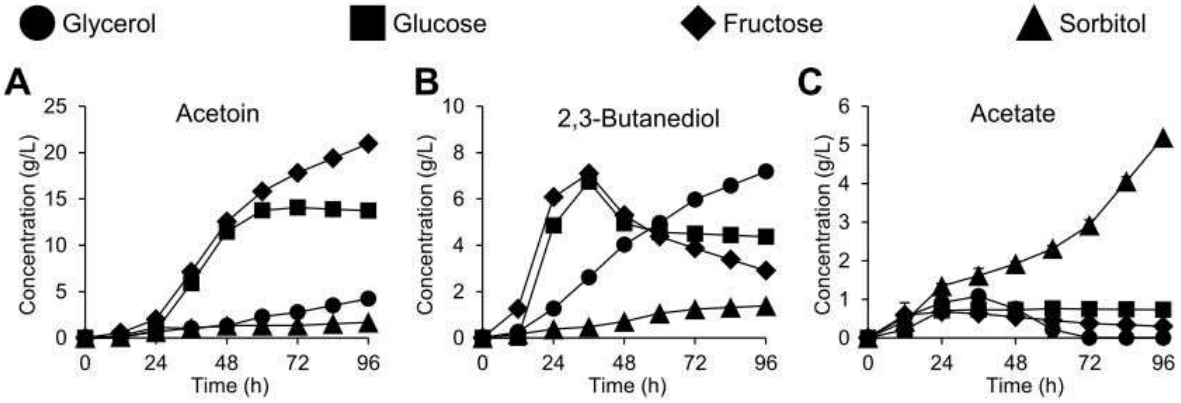

図 3.3 副産物の分析結果. 丸は glycerol，四角は glucose，菱型は fructose，三角は sorbitol を表す. A は acetoin 濃度，B は 2,3-butanediol 濃度，C は acetate 濃度を示している. すべての結果は反復数 3 で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す.

以上の結果から，それぞれ異なる糖，もしくは糖アルコールを添加した培地では細

胞は異なる代謝状態にあることが示唆された.

3.3.2. PGA の分子量推移

それぞれの培地における PGA の分子量の推移に与える影響を検討するために, SEC の結果から poly(ethylene oxide/glycol)で作成した検量線を用いて測定した.

本研究では数種類ある分子量の算出法の中でも重量平均分子量 (weight average molecular weight: M_w)を用いた．以下にその式を示す.

$$M_w = \frac{\sum M_i^2 N_i}{\sum M_i N_i}$$

N_i は分子量 M_i の分子の数を表す．上記の式からわかるように，本算出方法によって得られる M_w は，M_i に重みづけしてあるため，高分子の存在に大きく影響を受ける．つまり, 高分子の PGA が多く含まれているほど, M_w はより高い値を示すことになる．PGA の生産初期である 24 時間における分子量はそれぞれの培地で 2.3~2.8 × 10^6 Da であった (図 3.4). その後 glycerol 培地では，M_w が培養時間の経過とともに減少していった. 一方で PTS-sugars 培地では glycerol 培地に比べゆるやかに M_w が低下していた．次に，PGA の分子量は広く分布しているため，多分散性からその分散を評価した．多分散性は M_w/数平均分子量 (number average molecular weight: M_n)で求められ，M_n は以下の式で求められる.

$$M_n = \frac{\sum M_i N_i}{\sum N_i}$$

つまり M_n は M_w に比べ低分子に影響を受けやすく, 分子量の分散が広いほど両者の値の差は大きくなる．つまり多分散性が大きければ大きいほど分子量の分散が大きい，つまり PGA の分子量が大きく減少しているということが言える．それぞれの培地における多分散性を求めた結果，glycerol 培地では PGA 生産初期から終期にかけて 2.4~4.0 で推移したのに比べ，PTS-sugars を含む全ての培地で 1.9~2.9 と低い値で推移していた．以上の結果から glycerol 培地では PTS-sugars 培地に比べ PGA 幅広い分子量の PGA が培養時間の経過とともに蓄積していたと示唆された.

一方で，PGA の生産について類似した結果を示した fructose 培地と sorbitol 培地は glucose 培地と傾向は類似しているもののやや異なる結果を示した．Fructose 培地と sorbitol 培地では PGA の生産量が低く，これにより，検出されるピーク幅はほかのものに比べて小さかった. ピークの裾のあたりの結果は M_w や M_n といった値に影響を与えてしまう．しかしながら，今回得られた結果はすべて目視で，glucose 培地，fructose 培地，sorbitol 培地における PGA のピークトップが培養後期までは，glycerol 培地の結果よりも早いことを確認している．よって，fructose 培地及び sorbitol 培地と glucose 培地の間で観測された違いは誤差として扱い，以後は glycerol 培地と PTS-sugars 培地の間で議論する．

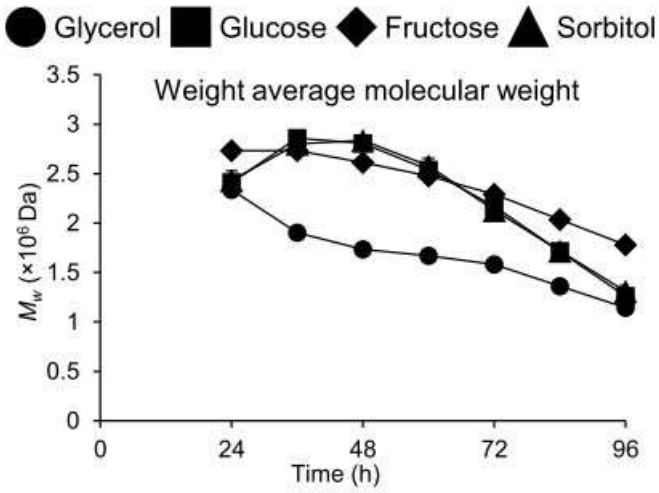

図 3.4 PGA の分子量測定結果．丸は glycerol，四角は glucose，菱型は fructose，三角は sorbitol を表す．すべての結果は反復数 3 で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す.

以上，PGA の分子量推移は glycerol 培地と PTS-sugars 培地で異なる傾向を示した．培地成分の分析結果ではそれぞれの培地は異なる傾向を示したのに対し, PGA の分子量推移に関しては PTS-sugars 培地で培養した細胞内で何らかの共通した代謝制御が起きている可能性が示され，それは高分子 PGA の生産に有力な手掛かりとなると考えられた.

3.3.3. メタボローム解析

これまでの結果から, PGA の分子量推移は glycerol と PTS-sugars の 2 群間で違いが確認された．そこでそれぞれの培地において細胞内代謝状態がどのように異なるか観察するために培養開始後 24 時間から 60 時間までの細胞に対してメタボローム解析を行った．そして，この 2 群間でそれぞれに特徴的な代謝物をより顕著に特定するために，得られたメタボロームデータを Orthogonal partial least squares-discrimination analysis (OPLS-DA)へ供した．OPLS-DA は Orthogonal partial least squares (OPLS)という多変量回帰分析法を用いた判別分析法の一つである．まず，OPLS は多数の説明変数から目的とする応答変数の回帰モデルを構築する手法である．最大の特徴は，説明変数のうち，応答変数に対して相関のあるものを潜在変数へ，無相関のものを直行変数へそれぞれ集約することで，データを解釈しやすいモデルを構築できることにある．そしてどちらの群に対して相関があるかを得ることができる．OPLS-DA は OPLS の応答変数部分に，それぞれの解析対象群に対して疑似応答変数 (例えば 2 群の判別であれば，片方を 1，もう一方を 2 といった具合)を与えることで回帰モデルを構築する手法である．本手法によって得られたモデルに対して，それぞれの説明変数がどのくらい正，もしくは負にモデル構築に寄与していたかといった情報を得ることができる．つまり，前述の例であれば，正に相関があれば疑似応答変数 2 が与えられた群，負に相関があれば疑似応答変数 1 が与えられた群にそれぞれ特徴的な説明変数であるといえる．

本研究ではメタボローム解析によって得られた代謝物プロファイルデータを説明変数として glycerol 培地と PTS-sugars 培地の 2 群間における判別モデルを構築した．その結果，モデルの直線性を表す R^2 値と堅牢性を表す Q^2 値がそれぞれ 0.97 と 0.95 のモデルが構築された．そして，2 群においてそれぞれ特徴的な代謝物を，各説明変数のモデル構築に対する重要度を表す variable importance in projection (VIP)値が 1 以上の代謝物という基準で選択し，そのローディング値を図 3.5 に示した．ローディング

値が負の値の化合物は glycerol 培地において特徴的な代謝物であり，正の値の化合物は PTS-sugars 培地において特徴的な代謝物である．以下にその特徴的な代謝物についての考察を述べる．

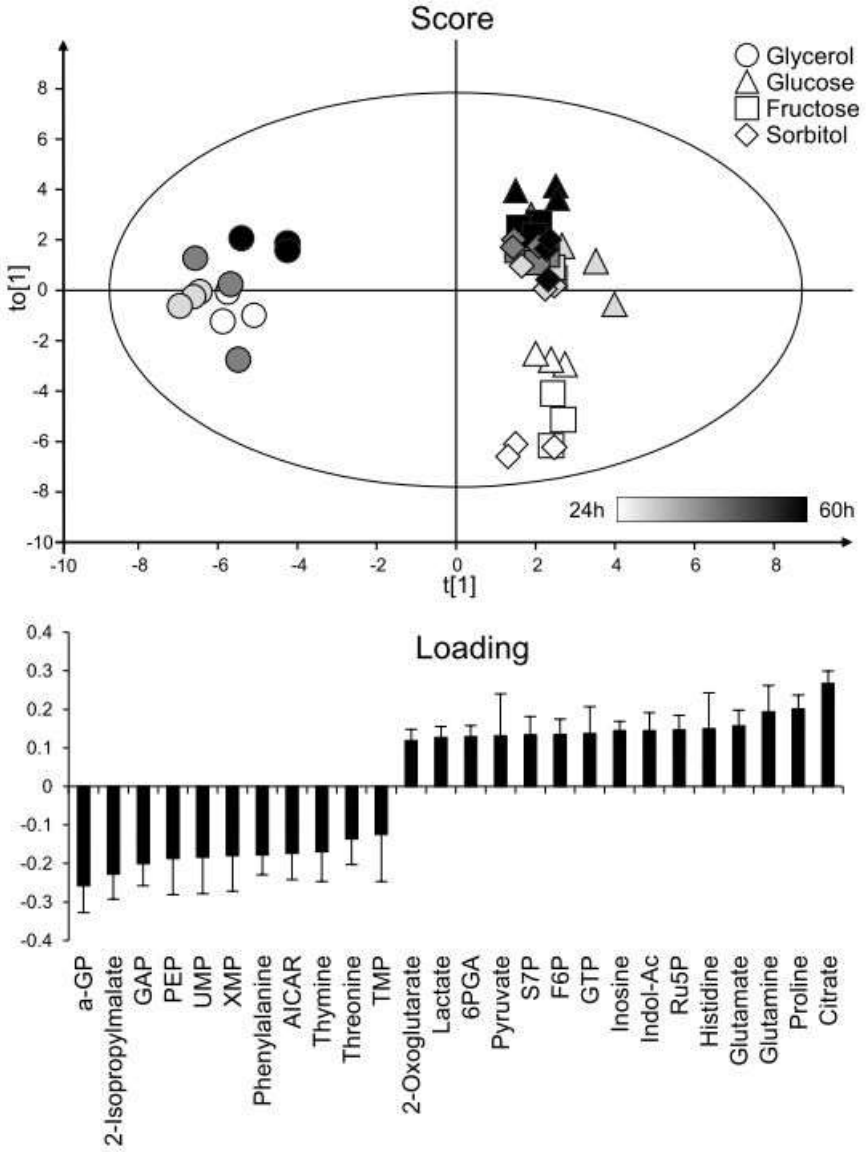

図 3.5 メタボロームデータを用いた OPLS-DA 結果．A はスコアプロットを表しており，丸は glycerol，四角は glucose，菱型は fructose，三角は sorbitol を表す．24 時間から 60 時間にかけての結果は白から黒へのグラデーションで表す．B は VIP 値が 1 以上の化合物のローディング値を示している．すべての結果は反復数 3 で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す．

まず，glycerol 培地において PEP が蓄積しており，PTS-sugars 培地では pyruvate が蓄積していた．PEP は PTS において取り込まれる糖をリン酸化するために使用される

リン酸基の供給源であり，PTS によってリン酸基を転移した後，pyruvate へと変換される．つまりそれぞれの培地における PEP と pyruvate の蓄積は PTS の利用の有無によるものを反映していると言える. また, PTS-sugars 培地で培養した細胞中では 6PGA, S7P，Ru5P といったペントースリン酸経路関連代謝物が蓄積していた．ペントースリン酸経路関連代謝物の蓄積は PTS-sugars 培地で観測された高い増殖能と一致するといえる．一方で，citrate，glutamine，GTP，2OG が PTS-sugars 培地で培養した細胞に蓄積しており，2-isopropylmalate が glycerol 培地で培養した細胞に蓄積していた．以下にそれぞれの代謝物について考察を述べる．

まず，GTP は，カタボライト制御タンパク質の一つである CodY の活性化因子として知られている (74)．そして第 2 章の結果から，この CodY は活性化することにより aconitase と glutamate synthase の発現を阻害し，細胞内における citrate，glutamine，２OG の蓄積を引き起こす, と示唆された. つまり今回 PTS-sugars 培地で観測された GTP と citrate，glutamine，2OG の蓄積は PTS-sugars 培地において CodY の活性化を指示しているといえる．次に，glycerol 培地で蓄積していた 2-isopropylemalate は leucine 生合成経路の中間体である． 24 時間から 36 時間にかけて，glycerol 培地で培養した細胞では 2-isopropylmalate に加えて, leucine 化合物の蓄積量が増加していたが, PTS-sugars 培地で培養した細胞内では減少していた (図 3.6). CodY は分岐鎖アミノ酸 (branched chain amino acids: BCAAs，leucine，isoleucine，valine のこと)の生合成経路に関連する遺伝子をコードする *ilv-leu* オペロンの発現を負に制御することが報告されている (75,76)．つまり以上の結果は，PTS-sugars 培地で培養した細胞において CodY が活性化している可能性を示しているといえる．

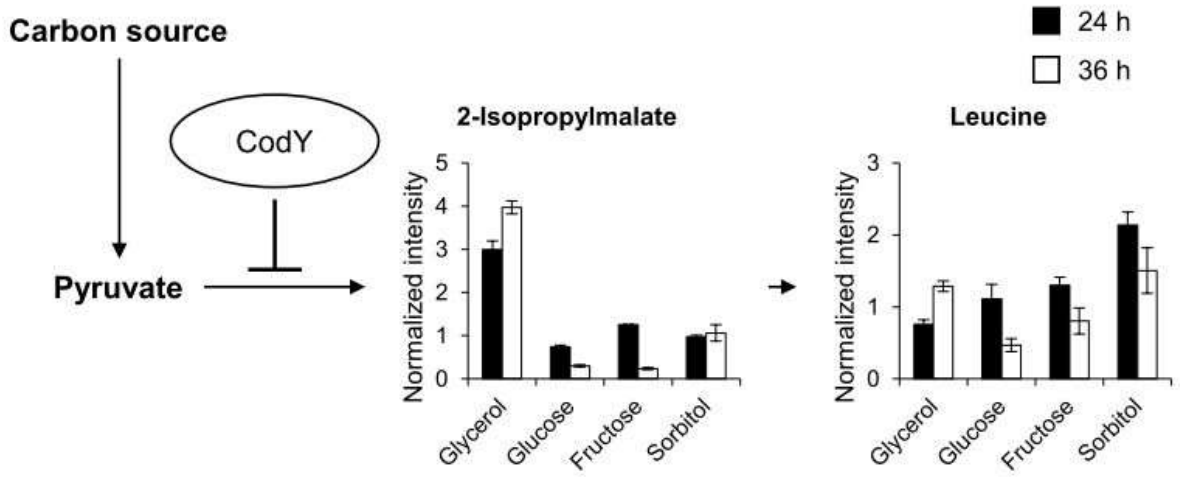

図 3.6 Leucine 生合成経路の代謝物分析結果．黒い棒グラフは培養 24 時間の結果を示し，白い棒グラフは 36 時間の結果を示している．すべての結果は反復数 3 で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す．

3.3.4. 分岐鎖アミノ酸添加による PGA 発酵への影響

メタボローム解析の結果から，CodY が PTS-sugars 培地で培養した細胞の中で活性化しており，PGA の生産と分解を抑制していることが示唆された．分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acids: BCAAs)は CodY の活性化因子として知られており，CodY 活性化による発現制御に関する研究で頻用されている (77)．そこで本実験では CodY の PGA 発酵への影響を検討するために，glycerol 培地へ BCAAs をそれぞれ添加して培養を行った．

また，本実験における PGA の分子量の推移を図 3.7 に示す．培養 24 時間の時点ではすべての培地に含まれる PGA の M_w は約 2.7×10^6 Da であった．そして，BCAAs 非添加の control 培地では 24 時間以降分子量が低下しているのに対して，それぞれの BCAAs 添加培地では 36 時間で M_w が増加し，そこからゆるやかに低下していった．この培養中の多分散性を求めたところ，BCAAs 非添加培地では 2.2~4.2 であったのに対し，isoleucine 添加培地では 2.1~2.7，leucine 添加培地では 2.0~3.5，valine 添加培地

では 2.2~4.0 と，いずれの培地においても低い値を示した．これらの結果は，BCAAs の添加により PGA の分解を抑制でき，非添加の場合よりも高分子の PGA を維持できることを示している．また，PGA 生産速度や分子量の推移が同じ濃度の BCAAs の間でも異なることから，それぞれの BCAAs が持つ阻害活性にも違いがあることが示唆された．

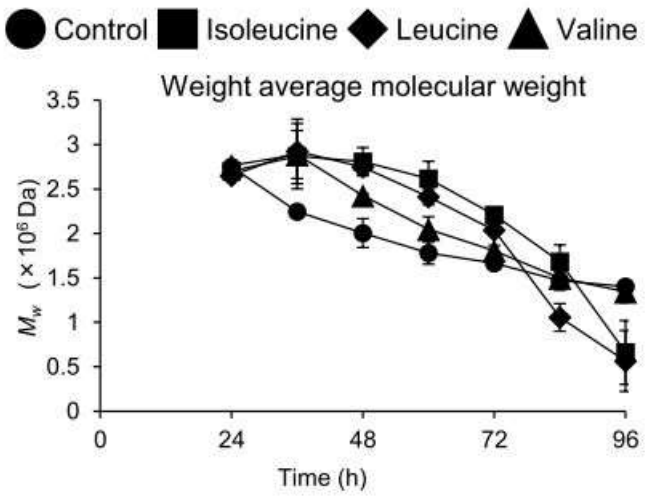

図 3.7 PGA の分子量測定結果．丸は非添加，四角は isoleucine 添加，菱型は leucine 添加，三角は valine 添加を表す．すべての結果は反復数 3 で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す．

残念ながら，PGA の分子量推移に関する制御機構については，PGA depolymerase のようなタンパク質の関与が示唆されている程度にとどまっており，いまだ未解明な点が多く残されているため，BCAAs による分子量低下の抑制について，詳細な考察を行うことは難しい．しかし，一つの可能性として，BCAAs が引き起こしたであろう分子量低下の抑制は，PGA synthetase をコードする *pgsBCA* オペロンの後方に位置する *pgdS* にコードされている PGA depolymerase が関係していると考えられる．*B. subtilis* を用いた *pgdS* に関するこれまでの研究から，*pgdS* の発現はρ因子非依存性ターミネーターが *pgsBCA* と *pgdS* の間に存在するため，*pgsBCA* オペロンとは独立して σ^D 因子依存的に行われていることが報告されている (42)．さらにσ^D 因子の発現は

CodY によって負に制御されていることも明らかとなっている (78). つまり，PGA depolymerase をコードする *pgdS* の発現は CodY によって間接的に負に制御されていることが示唆される．メタボローム解析の結果から，PTS-sugars 培地において細胞内の CodY が活性化していることが示唆されており, 培地中には高分子の PGA がより多く蓄積していることから, PTS-sugars 培地において活性化した CodY は PGA の生産だけでなく，分解の制御にも関与していると示唆された.

また，BCAAs の添加によって 72 時間までは非添加培地に比べ高分子の PGA を維持することができたが，それ以降では非添加と同等か，より低分子化されてしまっていた．BCAAs は細胞内で直接 CodY と相互作用することで CodY を活性化している．そこで, BCAAs 培地において分子量が低下し始めた培養 36 時間から 60 時間までの，細胞内 BCAAs の分析結果を図 3.8 に示した．培養 36 時間では，BCAAs 添加培地において，isoleucine 添加培地なら isoleucine のみが蓄積している (図 3.8A)，といったように，それぞれ添加された BCAA が細胞内で蓄積しており，添加されていない BCAAs においては BCAAs 非添加培地と同等かそれ以下の結果を示した．しかしながら，培養 48 時間から 60 時間にかけて，すべての培地で培養した細胞において，すべての BCAAs の増加が観測された．CodY は前述のように BCAAs の生合成経路を負に制御しているため，本結果は 36 時間以降に CodY の活性が低下した可能性を示している．CodY の発現は栄養細胞増殖期にのみ発現する σ^A 因子によって制御されているため， CodY の発現は定常期以降に抑制されてしまう (79). つまり 48 時間以降の BCAAs の蓄積は CodY の活性低下による影響と考えられ，培養後期の分子量低下は本研究が着目した BCAAs 添加による影響ではなく，別の原因によるものと考えられる.

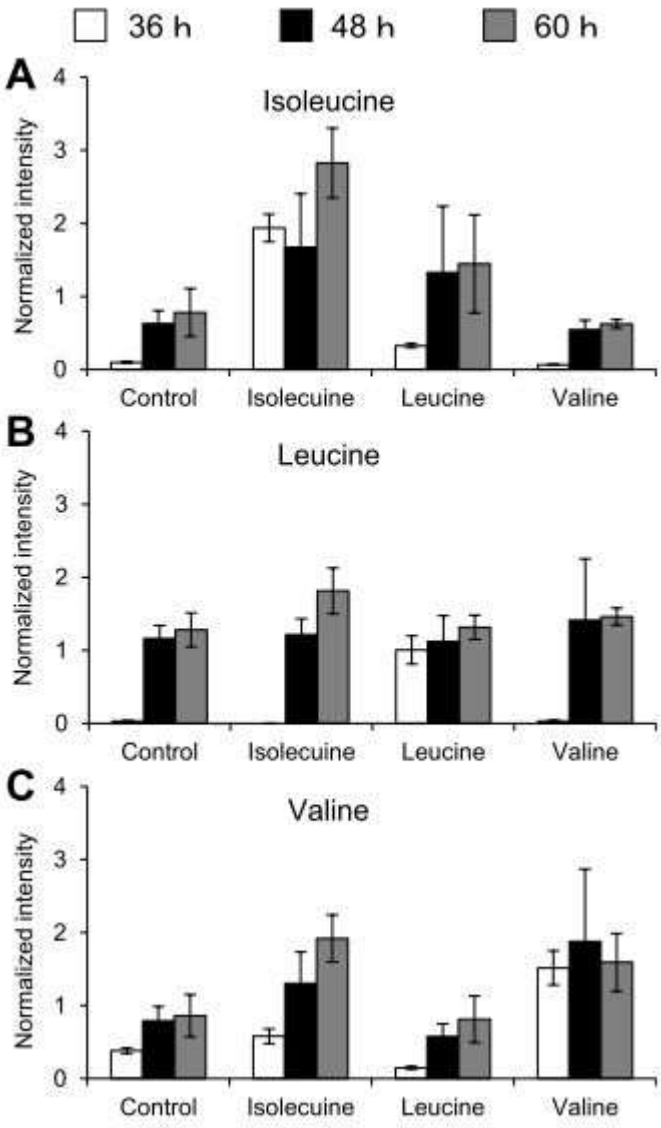

図 3.8 細胞内分岐鎖アミノ酸の分析結果．A は isoleucine，B は leucine，C は valine の結果を表す．白は培養 36 時間，黒は 48 時間，灰色は 60 時間の結果を表す．すべての結果は反復数 3 で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す．

また，培養開始後 36 時間までは BCAAs 添加培地において増殖の遅れがあったが，それ以降は類似した増殖を示した (図 3.9A)．さらに，glycerol の消費や副産物の蓄積についてもすべての培地でほぼ同様の結果となった．

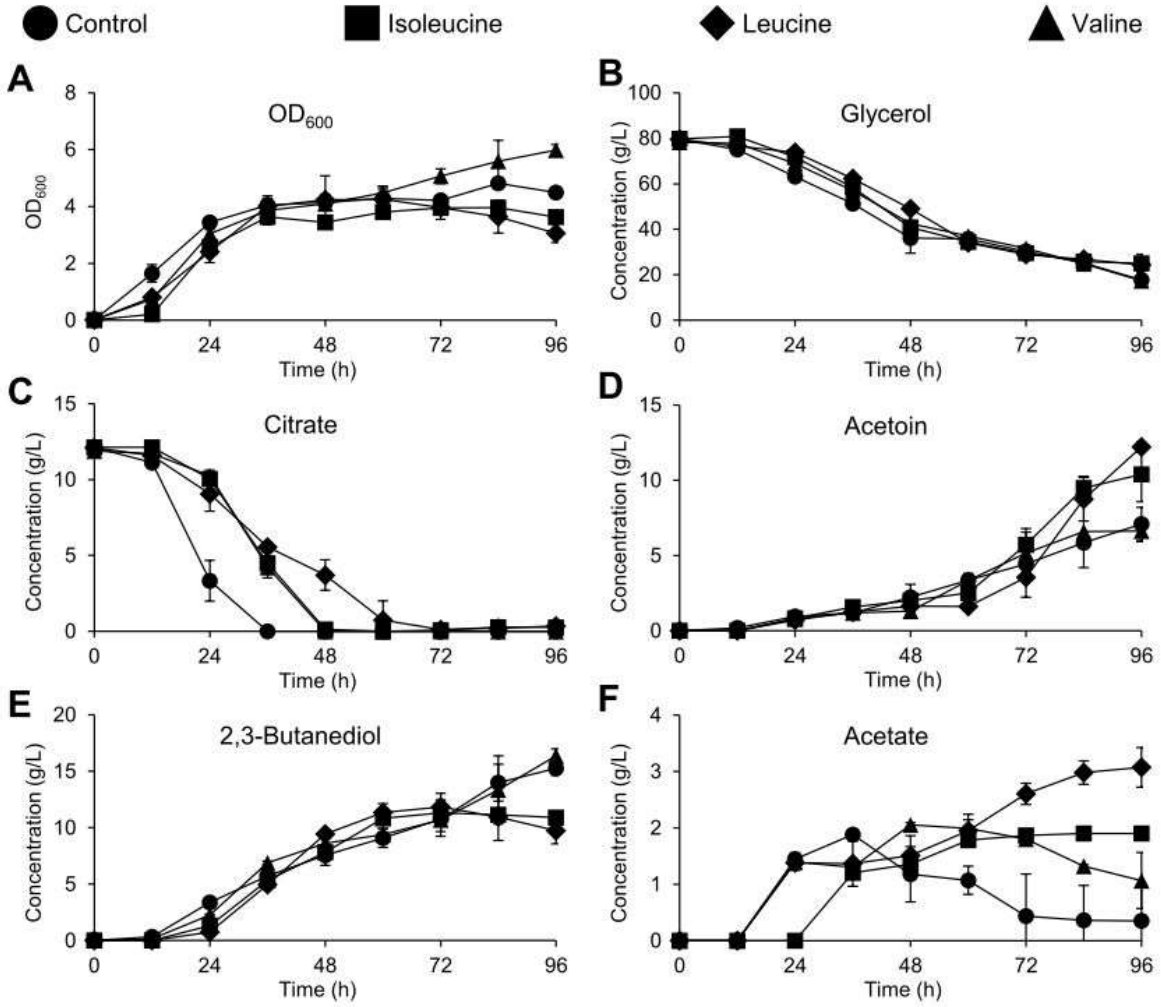

図 3.9 BCAAs 添加実験における培地成分の分析結果．丸は非添加，四角は isoleucine 添加，菱型は leucine 添加，三角は valine 添加を表す．A は OD_{600} 値，B は glycerol 濃度，C は citrate 濃度，D は acetoin 濃度，E は 2,3-butanediol 濃度，F は acetate 濃度を示している．すべての結果は反復数 3 で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す．

一方で，PGA の主な基質である citrate の消費は BCAAs の添加によって抑制されていた (図 3.9C)．さらに，図 3.10 にそれぞれの培地における PGA の生産量と，12 時間ごとの比生産速度を示した．最終的な生産量はすべての培地で同様の結果となったが，BCAAs を添加した培地では比生産速度の低下が観測された．Glycerol 培地において 0.24 g/h g-Dry cell weight (DCW)と最も高い比生産速度が観測され，isoleucine 添加培地では 0.21 g/h g-DCW，leucine 添加培地では 0.16 g/h g-DCW，valine 添加培地では 0.18 g/h g-DCW という結果だった．前述のように CodY は citrate を isocitrate へ変換す

る反応を触媒する aconitase の発現を負に阻害するため，BCAAs の添加によって細胞内の citrate が蓄積し，citrate の取り込みが阻害されたと考えられる．そして citrate は PGA の主な炭素源として利用されるため, BCAAs 添加培地において PGA の比生産速度が低下したと考えられる.

補足的な結果ではあるが, 低濃度の isoleucine の添加実験についても付記する. 1 mM の isoleucine を添加して培養を行ったとき, 培養開始後 36 時間の時点で培養液に大量の泡が発生していることが確認された．これは，高分子の PGA によって発生した強い粘性によってフラスコの回転運動に培養液が追いつかなくなってしまい発生したものと考えられる．残念ながら，泡が発生してしまうと培養中の酸素条件が大きく変化してしまい，他の結果と比較できないため本論文では結果を除外した．しかしながら，本実験で観測された結果は，将来的に粘性の高い培地中でも溶存酸素濃度を制御できる技術が確立されれば，PGA の分解を制御することによって，高分子の PGA の大量生産が可能であることを指し示している，と言える.

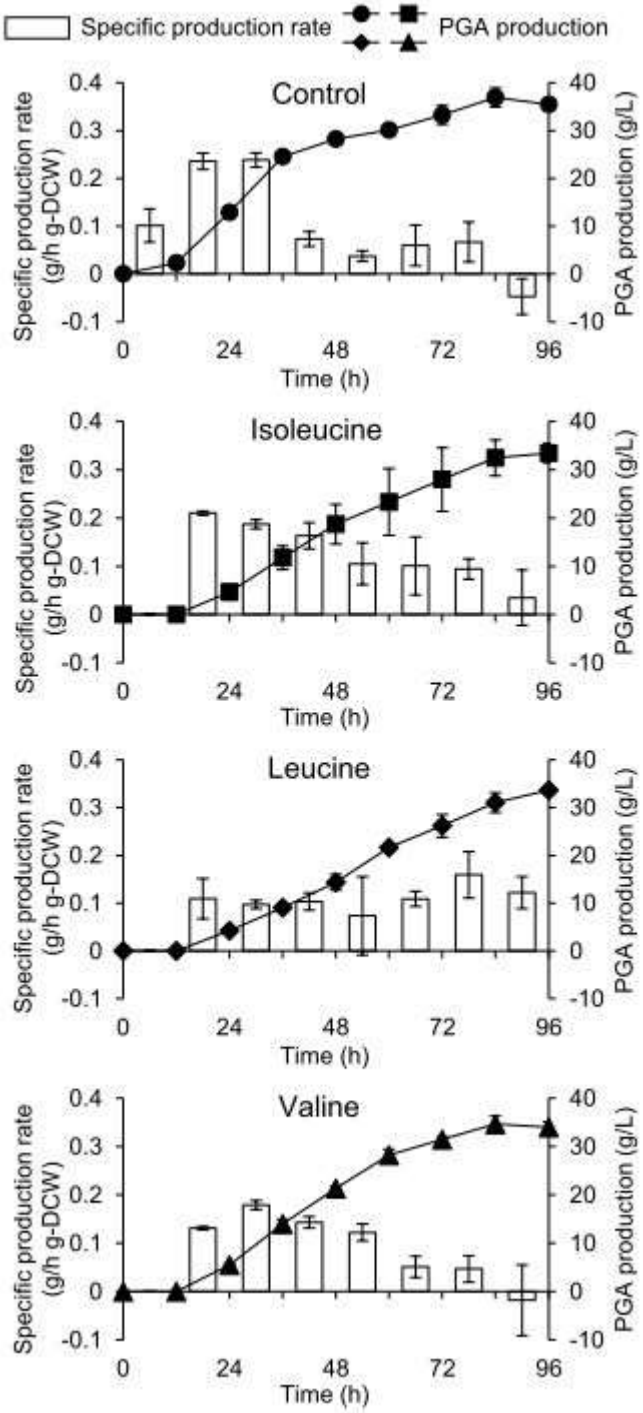

図 **3.10 BCAAs** 添加実験における **PGA** の分析結果．丸は非添加，四角は **isoleucine** 添加，菱型は **leucine** 添加，三角は **valine** 添加を表す．棒グラフは比生産速度 (左縦軸)を表し，折れ線グラフは培地中の **PGA** 濃度 (右縦軸)を表す．グレーの棒グラフはその培地における最高の生産速度を示している. すべての結果は反復数 **3** で行った結果でありエラーバーは標準偏差を表す.

3.4. 小括

本章ではPTSを介して取り込まれる単糖と糖アルコール, そして自然拡散によって取り込まれるglycerolでは培養中のPGAの分子量推移が異なる結果を示すことに着目し，両者を比較することによって，PGA の分解に寄与する因子を特定し，PGA の分解を制御することを試みた.

OPLS-DAによって得られた結果はPTS-sugarsを含む培地で培養した細胞ではCodYが活性化していることを指し示しており，過去の文献 (78,80)からも CodY は間接的に PGA depolymerase の発現を抑制していると示唆された．そこで BCAAs を用いてglycerolを含む培地においてCodYを活性化させたところ, 非添加の培地に比べてPGAの分解が抑制される結果が得られた.

先行研究においても CodY に着目して PGA の分解を制御した報告はなく，本研究が初めての試みとなる.

将来的に PGA をさらに応用していくためには分子量の制御は非常に重要な要素であるといえ，本研究で示された結果は細胞内代謝制御の理解により，その分子量の制御が可能となることを示すものである.

第4章 総括

本論文は，これまで経験則的に行われていた PGA の発酵生産に対して，メタボローム解析を用いることにより考察された細胞内代謝状態を元に，戦略的に発酵を制御することを試みたものである. メタボローム解析を PGA 生産時における *Bacillus* 属に対して行った前例はなく，本研究が初めての試みとなる．得られた結果はこれまで部分的に明らかとなっていた分子細胞生物学的な *B. subtilis, B. licheniformis* の先行研究の結果とよく一致しており，それぞれの研究をつなげ論理的な戦略を構築する上でメタボローム解析が強力な手段となることを示しており, PGA の発酵制御には細胞内代謝制御機構を理解する必要があることを改めて示すものである.

第 2 章では glucose と glycerol をそれぞれ培養に用いた場合，異なる PGA 生産能を示すことに着目し，それぞれの培地で培養した細胞に対してメタボローム解析を行った．得られたメタボロームデータを PCA に供したところ，それぞれの培地に特徴的な代謝物が抽出された (図 2.2). 抽出された代謝物からそれぞれの細胞が置かれている代謝状態を考察したところ，いずれの細胞も glutamate の生合成に GOGAT/GS 経路を用いているが，glucose 培地では GTP，isoleucine，valine といったカタボライト制御タンパク質の 1 つである CodY の活性化因子が細胞内で蓄積しており，それにより培地中の citrate を glutamate へ変換するために必要な aconitase と GOGAT の発現が抑制されてしまい生産能が低下していることが示唆された．得られた結果は PGA の生合成に関して，L-glutamate は直接使われるわけではなく，citrate から生合成された 2OG とともに glutamate を生合成するのに必要な glutamine の生合成の基質となることが示唆され，glycerol や glucose は細胞形成のための炭素源としか使われていない，といった，全体としての炭素源の流れを把握することを可能とした．さらに GOGAT/GS 経路が glutamate の生合成に用いられているということは，炭素骨格としての 2OG の素になる citrate に加えて ammonium が必要であることを予測できた．そこで断続的に citrate 及び ammonium を培地へ添加することにより，53.97 g/L という，これまで本菌

株を用いた報告の中で最も高い生産量を達成することができた (図 2.5).

また，第 3 章では,第 2 章において glucose と glycerol をそれぞれ用いた場合，培養中の PGA の分子量推移が異なることに着目した．第 2 章で炭素源が異なる場合，細胞内代謝状態は顕著に変化することが示されたことから，本章では前述の glucose 以外の PTS permease family によって細胞内に取り込まれる fructose と sorbitol についても培養を行い，メタボローム解析をすることで，その PGA の分子量推移に対する影響を細胞内代謝物情報から検討した．その結果， glycerol 培地で PGA の分子量が培養 24 時間以降速やかに低下していくのに比べ, PTS によって取り込まれる PTS-sugars を用いた場合はその分子量の低下が抑制されていることが観測された．そこで PGA の分子量推移に影響を与えている因子を探索するために，メタボロームデータを OPLS-DA に供し，glycerol と PTS-sugars の 2 群にそれぞれ特徴的な代謝物を探索した. その結果, PTS-sugars の培地で培養した細胞では, CodY の活性化因子である GTP が蓄積しており，さらに CodY で負に制御されている leucine 生合成経路や glutamate 生合成経路が抑制されていることが示唆された．つまり，PTS-sugars 培地において CodY が活性化していることが示唆された. CodY はカタボライト制御タンパク質として多くの遺伝子発現を制御することから， CodY の活性化が PGA の分子量低下を抑制する因子の一つである，という仮説をたて，glycerol 培地へ CodY の活性化因子である BCAAs (isoleucine，leucine，valine)を添加した際の影響を検討した．その結果, PGA の生産が盛んな培養 60 時間まで，BCAAs 添加によって高分子の PGA を維持することに成功した.

以上，本研究はメタボローム解析が PGA 発酵性能の違いに寄与する代謝物を特定し，論理的に発酵制御の戦略を構築するのに強力な手段となりうることを示した.

これまでの PGA 生産に関する研究は培地組成や培養条件に関するものが多く，遺伝子改変によって生産性を高める取り組みは比較的少なかった．その大きな理由の 1 つが, PGA 生産時における細胞内代謝制御機構に関する知見の不足である．しかしな

がら，本研究で示唆された細胞内代謝制御機構はこれまで解明されていた既知の *Bacillus* 属の分子細胞生物学的な知見と PGA 生産性という表現型を紐付けすることで得られたものである．そのため本研究で得られた結果は，細胞内の代謝状態を把握することができれば，これまでの研究にない新たな遺伝子改変ターゲットを探索する可能性を与えるものであるといえる．

謝辞

本研究全般に亘り，終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科　福崎英一郎　教授に謹んで深甚の謝意を表します．

また，本論文作成に当り有益なご指導，ご助言，及びご校閲を賜りました大阪大学大学院工学研究科　藤山和仁教授，　大政健史　教授に厚く感謝申し上げます．

本研究に当り，細部に渡るご指導ならびに日頃からの貴重なご助言と励ましの言葉を頂きました九州大学大学院生体防御医学研究所　馬場健史　教授に心から感謝申し上げます．

また，日頃より貴重なご助言を頂きました大阪大学工学研究科　新間秀一　准教授，小野比佐好　助教に厚く御礼申し上げます．

本研究に深いご理解と全面的なご支援を頂きましたアーヘン工科大学　Jochen Büchs 教授に深く感謝申し上げます．

本研究推進に当り，アーヘン工科大学 Lena Meissner 修士並びに研究室の皆様から多大なご協力を得ましたことに厚く御礼申し上げます．

論文執筆にあたり，必要となる英語，そして論理的思考力を磨いてくださった Sastia Prama Putri 博士，Walter Alvarez Lavina 博士に厚く御礼申し上げます．

日ごろから研究室でのディスカッションを含め，私の学生生活を実りあるものにしてくださった川瀬　直樹　修士，野口　真吾　修士に深く感謝いたします．

そして，博士への思いを託してくれ，遠方から常に応援してくれていた隅倉　哲哉　学士に厚く御礼申し上げます．

本研究に当りお世話になりました大阪大学大学院工学研究科　生命先端工学専攻　生物資源工学領域の研究員スタッフ，学生，事務の皆様に感謝申し上げます．

また，常に気をかけてくださり，多大なるご支援をいただきました叔父，叔母である川島哲史　氏，川島　幸子　氏に心から感謝の意を表します．

最後に，常に心の支えとなり，応援してくれた家族と両親に心から感謝致します．

引用文献

1. **Kahar, P., Iwata, T., Hiraki, J., Park, E.Y., Okabe, M.**: Enhancement of ε-polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control., J. Biosci. Bioeng., **91**, 190–194 (2001).

2. **Diniz, S.C., Voss, I., Steinbüchel, A.**: Optimization of cyanophycin production in recombinant strains of *Pseudomonas putida* and *Ralstonia eutropha* employing elementary mode analysis and statisical experimental design., Biotechnol. Bioeng., **93**, 698–717 (2006).

3. **Ivànovics, G., Bruckner, V.**: Chemical and Immuno-logical Studies on the Mechanism of Infection and Immunity in Anthrax. The Chemical Structure of the Capsular Substance of *B. anthracis* and of the sero-logieally Identical Substance in *B. mesentericus*., Z. Immun. exp. ther., **90**, 304–318 (1937).

4. **Mitsui, N., Murasawa, H., Sekiguchi, J.**: Disruption of the cell wall lytic enzyme CwlO affects the amount and molecular size of poly-γ-glutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (*natto*), J. Gen. Appl. Microbiol., **43**, 35–43 (2011).

5. **Makino, S.I., Uchida, I., Terakado, N., Sasakawa, C., Yoshikawa, M.**: Molecular characterization and protein analysis of the *cap* region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*., J. Bacteriol., **171**, 722–730 (1989).

6. **Zanuy, D., Alemán, C.**: Poly(gamma-glutamic acid) in aqueous solution: molecular dynamics simulations of 10- and 20-residue chains at different temperatures., Biomacromolecules, **2**, 651–7 (2001).

7. **Sung, M.H., Park, C., Kim, C.J., Poo, H., Soda, K., Ashiuchi, M.**: Natural and edible biopolymer poly-gamma-glutamic acid: Synthesis, production, and applications., Chem. Rec., **5**, 352–366 (2005).

8. **Jeong, G.-T., Kim, J.-N., Ryu, H.-W., Wee, Y.-J.**: Improved production of poly(γ-glutamic acid) by *Bacillus subtilis* RKY3 and its recovery from viscous fermentation

broth as a biodegradable polymer., J. Chem. Technol. Biotechnol., **89**, 728–734 (2013).

9. **Li, X., Gou, X., Long, D., Ji, Z., Hu, L., Xu, D., Liu, J., Chen, S.**: Physiological and metabolic analysis of nitrate reduction on poly-gamma-glutamic acid synthesis in *Bacillus licheniformis* WX-02., Arch. Microbiol., **196**, 801 (2014).

10. **Ho, G.-H., Yang, T.-H., Yang, K.-H.**: Stable biodegradable, high water absorbable γ-polyglutamic acid hydrogel by 3-dimensional cross-linking and its preparation method., US Pat. 7,759,088 B2, (2010).

11. **McLean, R.J.C., Beauchemin, D., Clapham, L., Beveridge, T.J.**: Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945., Appl. Environ. Microbiol., **56**, 3671–3677 (1990).

12. **McLean, R.J.C., Beauchemin, D., Beveridge, T.J.**: Influence of oxidation state on iron binding by *Bacillus licheniformis* capsule., Appl. Environ. Microbiol., **58**, 405–408 (1992).

13. **Ashiuchi, M.**: Microbial and enzymatic production of chiral nylon biopolymer., Seibutsu-kogaku, **86**, 73–79 (2008).

14. **Tanimoto, H., Fox, T., Eagles, J., Satoh, H., Nozawa, H., Okiyama, A., Morinaga, Y., Fairweather-Tait, S.J.**: Acute effect of poly-γ-glutamic acid on calcium absorption in post-menopausal women, J. Am. Coll. Nutr., **26**, 645–649 (2007).

15. **Mitsuiki, M., Mizuno, A., Tanimoto, H., Motoki, M.**: Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of oligo- and poly(glutamic acid)s, J. Agric. Food Chem., **46**, 891–895 (1998).

16. **Ben-Zur, N., Goldman, D.M.**: γ-Poly glutamic acid: a novel peptide for skin care, Cosmet. Toilet., **122**, 65–74 (2007).

17. **Taniguchi, M., Kato, K., Shimauchi, A., Xu, P., Fujita, K.-I., Tanaka, T., Tarui, Y., Hirasawa, E.**: Physicochemical properties of cross-linked poly-γ-glutamic acid and its flocculating activity against kaolin suspension., J. Biosci. Bioeng., **99**, 130–135 (2005).

18. **Li, C., Yu, D.-F., Newman, R.A., Cabral, F., Stephens, L.C., Hunter, N., Milas, L., Wallace, S.**: Complete regression of well-established tumors using a novel water-soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate, Cancer Res., **58**, 2404–2409 (1998).

19. **Singer, J.W.**: Paclitaxel poliglumex (XYOTAX^{TM}, CT-2103): A macromolecular taxane., J. Control. Release, **109**, 120–126 (2005).

20. **Hsieh, C.-Y., Tsai, S.-P., Wang, D.-M., Chang, Y.-N., Hsieh, H.-J.**: Preparation of γ-PGA/chitosan composite tissue engineering matrices, Biomaterials, **26**, 5617–5623 (2005).

21. **Ashiuchi, M., Fukushima, K., Oya, H., Hiraoki, T., Shibatani, S., Oka, N., Nishimura, H., Hakuba, H., Nakamori, M., Kitagawa, M.**: Development of antimicrobial thermoplastic material from archaeal Poly-γ-L-glutamate and its nanofabrication., ACS Appl. Mater. Interfaces, **5**, 1619–1624 (2013).

22. **Bajaj, I., Singhal, R.**: Poly(glutamic acid)-An emerging biopolymer of commercial interest, Bioresour. Technol., **102**, 5551–5561 (2011).

23. **Gardner, J.M., Troy, F.A.**: Chemistry and biosynthesis of the Poly(γ-D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*., J. Biol. Chem., **254**, 6262–6269 (1979).

24. **Urushibata, Y., Tokuyama, S., Tahara, Y.**: Characterization of the *Bacillus subtilis ywsC* gene, involved in γ-polyglutamic acid production., J. Bacteriol., **184**, 337–343 (2002).

25. **Ashiuchi, M., Shimanouchi, K., Nakamura, H., Kamei, T., Soda, K., Park, C., Sung, M., Misono, H.**: Enzymatic synthesis of high-molecular-mass poly-γ-glutamate and regulation of its stereochemistry., Appl. Environ. Microbiol., **70**, 4249–4255 (2004).

26. **Wang, N., Yang, G., Che, C., Liu, Y.**: Heterogenous expression of poly-γ-glutamic acid synthetase complex gene of *Bacillus licheniformis* WBL-3, Appl. Biochem. Microbiol., **47**, 381–385 (2011).

27. **Cromwick, A.-M., A. Birrer, G., Gross, R.A.**: Effects of pH and aeration on γ-poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor

cultures, Biotechnol. Bioeng., **50**, 222–227 (1996).

28. **Richard, A., Margaritis, A.**: Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*., Biotechnol. Bioeng., **82**, 299–305 (2003).

29. **Goto, A., Kunioka, M.**: Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ-glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335, Biosci. Biotechnol. Biochem., **56**, 1031–1035 (1992).

30. **Meissner, L., Kauffmann, K., Wengeler, T., Mitsunaga, H., Fukusaki, E., Büchs, J.**: Influence of nitrogen source and pH value on undesired poly(γ-glutamic acid) formation of a protease producing *Bacillus licheniformis* strain, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., **42**, 1203–1215 (2015).

31. **Shih, I.L., Van, Y.T.**: The production of poly-(γ-glutamic acid) from microorganisms and its various applications, Bioresour. Technol., **79**, 207–25 (2001).

32. **Huang, J., Du, Y., Xu, G., Zhang, H., Zhu, F., Huang, L., Xu, Z.**: High yield and cost-effective production of poly(γ-glutamic acid) with *Bacillus subtilis*, Eng. Life Sci., **11**, 291–297 (2011).

33. **Ko, Y.H., Gross, R.A.**: Effects of glucose and glycerol on γ-poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a, Biotechnol. Bioeng., **57**, 430–437 (1998).

34. **Troy, F.A.**: Chemistry and biosynthesis of the poly(γ-D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*., J. Biol. Chem., **248**, 305–315 (1973).

35. **Wu, Q., Xu, H., Liang, J., Yao, J.**: Contribution of glycerol on production of poly(γ-glutamic acid) in *Bacillus subtilis* NX-2., Appl. Biochem. Biotechnol., **160**, 386–392 (2010).

36. **Moreno, M.S., Schneider, B.L., Maile, R.R., Weyler, W., Saier Jr, M.H.**: Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses, Mol. Microbiol., **39**, 1366–1381 (2001).

37. **Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R.P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., Sonenshein, A.L.**: Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis, J. Bacteriol., **185**, 1911–1922 (2003).

38. **Voigt, B., Hoi, L.T., Jürgen, B., Albrecht, D., Ehrenreich, A., Veith, B., Evers, S., Maurer, K.-H., Hecker, M., Schweder, T.**: The glucose and nitrogen starvation response of *Bacillus licheniformis*, Proteomics, **7**, 413–23 (2007).

39. **Yoshida, K., Yamaguchi, H., Kinehara, M., Ohki, Y., Nakaura, Y., Fujita, Y.**: Identification of additional TnrA-regulated genes of *Bacillus subtilis* associated with a TnrA box, Mol. Microbiol., **49**, 157–165 (2003).

40. **Ohsawa, T., Tsukahara, K., Ogura, M.**: *Bacillus subtilis* response regulator DegU is a direct activator of *pgsB* transcription involved in γ-poly-glutamic acid synthesis, Biosci. Biotechnol. Biochem., **73**, 2096–2102 (2009).

41. **Ishii, H., Tanaka, T., Ogura, M.**: The *Bacillus subtilis* response regulator gene *degU* is positively regulated by CcpA and by catabolite-repressed synthesis of ClpC, J. Bacteriol., **195**, 193–201 (2013).

42. **Feng, J., Gu, Y., Quan, Y., Cao, M., Gao, W., Zhang, W., Wang, S., Yang, C., Song, C.**: Improved poly-γ-glutamic acid production in *Bacillus amyloliquefaciens* by modular pathway engineering., Metab. Eng., **32**, 106–15 (2015).

43. **Feng, J., Gu, Y., Sun, Y., Han, L., Yang, C., Zhang, W., Cao, M., Song, C., Gao, W., Wang, S.**: Metabolic engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* for poly-gamma-glutamic acid (γ-PGA) overproduction., Microb. Biotechnol., **7**, 446–55 (2014).

44. **Bell, T.H., Joly, S., Pitre, F.E., Yergeau, E.**: Increasing phytoremediation efficiency and reliability using novel omics approaches., Trends Biotechnol., **32**, 271–280 (2014).

45. **Valdes, A.M., Glass, D., Spector, T.D.**: Omics technologies and the study of human

ageing., Nat. Rev. Genet., **14**, 601–7 (2013).

46. **Ludwig, H., Rebhan, N., Blencke, H.M., Merzbacher, M., Stülke, J.**: Control of the glycolytic *gapA* operon by the catabolite control protein A in *Bacillus subtilis*: A novel mechanism of CcpA-mediated regulation, Mol. Microbiol., **45**, 543–553 (2002).

47. **Wacker, I., Ludwig, H., Reif, I., Blencke, H.-M., Detsch, C., Stülke, J.**: The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: regulation of the *gltAB* operon by the catabolite control protein CcpA, Microbiology, **149**, 3001–3009 (2003).

48. **Thorne, C.B., GOMEZ, C.G., NOYES, H.E., HOUSEWRIGHT, R.D.**: Production of glutamyl polypeptide by *Bacillus subtilis*, J. Bacteriol., **68**, 307–15 (1954).

49. **Leonard, C.G., Housewright, R.D., Thorne, C.B.**: Effects of some metallic ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus subtilis*, J. Bacteriol., **76**, 499–503 (1958).

50. **Nakayama, Y., Tamada, Y., Tsugawa, H., Bamba, T., Fukusaki, E.**: Novel strategy for non-targeted isotope-assisted metabolomics by means of metabolic turnover and multivariate analysis, Metabolites, **4**, 722–739 (2014).

51. **Li, X., Long, D., Ji, J., Yang, W., Zeng, Z., Guo, S., Ji, Z., Qi, G., Chen, S.**: Sample preparation for the metabolomics investigation of poly-gamma-glutamate-producing *Bacillus licheniformis* by GC-MS, J. Microbiol. Methods, **94**, 61–67 (2013).

52. **Tsugawa, H., Arita, M., Kanazawa, M., Ogiwara, A., Bamba, T., Fukusaki, E.**: MRMPROBS: a data assessment and metabolite identification tool for large-scale multiple reaction monitoring based widely targeted metabolomics, Anal. Chem., **85**, 5191–5199 (2013).

53. **Dunn, W.B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J.D., Halsall, A., Haselden, J.N., et al.**: Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry, Nat. Protoc., **6**, 1060–1083 (2011).

54. **Tsugawa, H., Bamba, T., Shinohara, M., Nishiumi, S., Yoshida, M., Fukusaki, E.**: Practical non-targeted gas chromatography/mass spectrometry-based metabolomics platform for metabolic phenotype analysis, J. Biosci. Bioeng., **112**, 292–298 (2011).

55. **Plumbridge, J.**: Expression of *ptsG*, the gene for the major glucose PTS transporter in *Escherichia coli*, is repressed by Mlc and induced by growth on glucose, Mol. Microbiol., **29**, 1053–1063 (1998).

56. **Reifenberger, E., Boles, E., Ciriacy, M.**: Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression, Eur. J. Biochem., **245**, 324–333 (1997).

57. **Yamamoto, H., Murata, M., Sekiguchi, J.**: The CitST two-component system regulates the expression of the Mg-citrate transporter in *Bacillus subtilis*, Mol. Microbiol., **37**, 898–912 (2000).

58. **Zhu, F., Cai, J., Wu, X., Huang, J., Huang, L., Zhu, J., Zheng, Q., Cen, P., Xu, Z.**: The main byproducts and metabolic flux profiling of γ-PGA-producing strain *B. subtilis* ZJU-7 under different pH values, J. Biotechnol., **164**, 67–74 (2013).

59. **Ramos, H.C., Hoffmann, T., Marino, M., Presecan-siedel, E., Dreesen, O., Nedjari, H., Glaser, P.**: Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and regulation of gene expression., J. Bacteriol., **182**, 3072–3080 (2000).

60. **Grundy, F.J., Waters, D.A., Allen, S.H.G., Henkin, T.M.**: Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA, J. Bacteriol., **175**, 7348–7355 (1993).

61. **Voigt, B., Hoi, L.T., Jürgen, B., Albrecht, D., Ehrenreich, A., Veith, B., Evers, S., Maurer, K.-H., Hecker, M., Schweder, T.**: The glucose and nitrogen starvation response of *Bacillus licheniformis*, Proteomics, **7**, 413–23 (2007).

62. **Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K.W., Sonenshein, a L.**: *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels, Genes Dev., **15**,

1093–103 (2001).

63. **Shivers, R.P., Sonenshein, A.L.**: Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids., Mol. Microbiol., **53**, 599–611 (2004).

64. **Phibbs, P. V., Bernlohr, R.W.**: Purification, properties, and regulation of glutamic dehydrogenase of *Bacillus licheniformis*, J. Bacteriol., **106**, 375–385 (1971).

65. **Donohue, T.J., Bernlohr, R.W.**: Properties of the *Bacillus licheniformis* A5 glutamine synthetase purified from cells grown in the presence of ammonia or nitrate, J. Bacteriol., **147**, 589–601 (1981).

66. **Bajaj, I.B., Singhal, R.S.**: Enhanced production of poly(γ-glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by using metabolic precursors, Appl. Biochem. Biotechnol., **159**, 133–141 (2009).

67. **Poo, H., Park, C., Kwak, M.-S., Choi, D.-Y., Hong, S.-P., Lee, I.-H., Lim, Y.T., Choi, Y.K., Bae, S.-R., Uyama, H., Kim, C.-J., Sung, M.-H.**: New biological functions and applications of high-molecular-mass poly-γ-glutamic acid, Chem. Biodivers., **7**, 1555–1562 (2010).

68. **Pérez-Camero, G., Congregado, F., Bou, J.J., Muñoz-Guerra, S.**: Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly(γ-glutamic acid)., Biotechnol. Bioeng., **63**, 110–115 (1999).

69. **Kubota, H., Nambu, Y., Endo, T.**: Alkaline hydrolysis of poly(γ-glutamic acid) produced by microorganism., J. Polym. Sci. Part A, **34**, 1347–1351 (1996).

70. **Kimura, K., Tran, L.-S.P., Uchida, I., Itoh, Y.**: Characterization of *Bacillus subtilis* γ-glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly-γ-glutamate, Microbiology, **150**, 4115–4123 (2004).

71. **Scoffone, V., Dondi, D., Biino, G., Borghese, G., Pasini, D., Galizzi, A., Calvio, C.**:

Knockout of *pgdS* and *ggt* genes improves γ-PGA yield in *B. subtilis*, Biotechnol. Bioeng., **110**, 2006–2012 (2013).

72. **Barabote, R.D., H. Saier Jr., M.**: Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system., Microbiol. Mol. Biol. Rev., **69**, 608–634 (2005).

73. **Faires, N., Tobisch, S., Bachem, S., Martin-Verstraete, I., Hecker, M., Stülke, J.**: The catabolite control protein CcpA controls ammonium assimilation in *Bacillus subtilis*, J. Mol. Microbiol. Biotechnol., **1**, 141–8 (1999).

74. **Handke, L.D., Shivers, R.P., Sonenshein, A.L.**: Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP, J. Bacteriol., **190**, 798–806 (2008).

75. **Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K., Fujita, Y.**: Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA, Mol. Microbiol., **56**, 1560–1573 (2005).

76. **Tojio, S., Satomura, T., Kumamoto, K., Hirooka, K., Fujita, Y.**: Molecular mechanisms underlying the positive stringent response of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon, involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids, J. Bacteriol., **190**, 6134–6147 (2008).

77. **Shivers, R.P., Dineen, S.S., Sonenshein, A.L.**: Positive regulation of *Bacillus subtilis ackA* by CodY and CcpA: Establishing a potential hierarchy in carbon flow., Mol. Microbiol., **62**, 811–822 (2006).

78. **Ababneh, Q.O., Herman, J.K.**: CodY regulates SigD levels and activity by binding to three sites in the *fla*/*che* operon., J. Bacteriol., **197**, 2999–3006 (2015).

79. **de Jong, I.G., Veening, J.W., Kuipers, O.P.**: Single cell analysis of gene expression patterns during carbon starvation in *Bacillus subtilis* reveals large phenotypic variation., Environ. Microbiol., **14**, 3110–3121 (2012).

80. **Brinsmade, S.R., Alexander, E.L., Livny, J., Stettner, A.I., Segrè, D., Rhee, K.Y., Sonenshein, A.L.**: Hierarchical expression of genes controlled by the *Bacillus subtilis* global regulatory protein CodY, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **111**, 8227–8232 (2014).

発表論文

Mitsunaga, H., Meissner, L., Palmen, T., Bamba, T., Büchs, J., Fukusaki, E.: Metabolome analysis reveals the effect of carbon catabolite control on the poly(γ-glutamic acid) biosynthesis of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945, J. Biosci. Bioeng., e-pub ahead of print (doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.08.012)

Mitsunaga, H., Meissner, L., Büchs, J., Fukusaki, E.: Branched chain amino acids inhibit the poly(γ-glutamic acid) degradation of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945, J. Biosci. Bioeng, just accepted.

その他の論文

Meissner, L., Kauffmann, K., Wengeler, T., Mitsunaga, H., Fukusaki, E., Büchs, J.: Influence of nitrogen source and pH value on undesired poly(γ-glutamic acid) formation of a protease producing *Bacillus licheniformis* strain. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., **42**, 1203-1215 (2015)

Rahmen, N., Schlupp., C. D., Mitsunaga, H., Fulton, A., Aryani, T., Esch, L., Schaffrath, U., Fukuzaki, E., Büchs, J.: A particular silent codon exchange in a recombinant gene greatly influences host cell metabolic activity. Microb. Cell Fact., **14**, 156-170 (2015).

書籍

光永均，馬場健史，Danang Waluyo，畠中治代，福崎英一郎: メタボローム解析を用いたキシロース資化性酵母の育種, pp. 47-56, in: 植田充美 監修， 合成生物工学の隆起－有用物質の新たな生産法構築をめざして－，vol. 1，CMC 出版，東京 (2012)

学会発表

1) 光永均，Danang Waluyo，畠中治代，馬場健史，福崎英一郎，
“メタボローム解析を用いた組換え酵母における キシロース発酵諸性能に関わる代謝経路の特定”
第 6 回メタボロームシンポジウム，大阪，2011 年 10 月

2) Hitoshi MITSUNAGA; Danang Waluyo; Haruyo Hatanaka; Takeshi Bamba; Eiichiro Fukusaki
“Identification of metabolic pathways related to xylose fermentation performance in recombinant yeast by metabolome analysis”
19th International Mass Spectrometry Conference (IMSC2012), Kyoto, September, 2012

3) 畠中治代，光永均，大村文彦，石黒正路，馬場健史，福崎英一郎
“Glucose 誘導性の分解を受けにくい alpha-glucoside transporter の発現が、酵母にもたらす増殖阻害”
第 65 回日本生物工学会大会，広島，2013 年 9 月

4) Hitoshi MITSUNAGA, Lena MEISSNER, Thomas PALMEN, Takeshi BAMBA, Jochen BÜCHS and Eiichiro FUKUSAKI
“Metabolome analysis of the poly (gamma-glutamic acid) producing bacteria, *Bacillus licheniformis*”
Aachen-Osaka Joint Symposium，Aachen, December, 2013

5) 畠中治代，光永均，大村文彦，石黒正路，馬場健史，福崎英一郎
“二種類の糖の同時資化が酵母にもたらす増殖阻害”

日本農芸化学会 2014 年度大会，東京，2014 年 3 月

6) Hitoshi Mitsunaga, Lena Meissner, Thomas Palmen, Takeshi Bamba, Jochen Büchs and Eiichiro Fukusaki

"Metabolome analysis of the poly (gamma-glutamic acid) producing bacteria, *Bacillus licheniformis*"

Metabolomics 2014，Tsuruoka, June, 2015

7) Hitoshi MITSUNAGA, Lena MEISSNER, Thomas PALMEN, Takeshi BAMBA, Jochen BÜCHS and Eiichiro FUKUSAKI

"Metabolome Analysis Revealed the Effect of Carbon Catabolite Repression on Poly (γ-glutamic) Acid Biosynthesis in *Bacillus licheniformis*"

International research training program "Selectivity in Chemo- and Biocatalysis" Aachen-Osaka Joint Symposium，Aachen, September, 2014

8) Hitoshi MITSUNAGA, Lena MEISSNER, Thomas PALMEN, Takeshi BAMBA, Jochen BÜCHS and Eiichiro FUKUSAKI

"Metabolome Analysis Revealed the Effect of Carbon Catabolite Repression on Poly(γ-glutamic acid) Biosynthesis in *Bacillus licheniformis*"

Biotechnology and chemistry for green growth, Osaka, March, 2015

9) HITOSHI MITSUNAGA, LENA MEISSNER, THOMAS PALMEN, TAKESHI BAMBA, JOCHEN BUECHS and EIICHIRO FUKUSAKI

"Metabolome analysis revealed the effect of carbon catabolite repression to poly(γ-glutamic acid) biosynthesis in *Bacillus licheniformis*"

日本農芸化学会 2015 年度大会，岡山，2015 年 3 月

10) 和泉自泰, 安藤晃規, 阪本鷹行, 光永均, 中尾素直, 岸野重信, 福﨑英一郎, 櫻谷英治, 島純, 小川順, 馬場健史
“油糧糸状菌 *Mortierella alpina* のメタボローム解析”
第 9 回メタボロームシンポジウム，静岡．2015 年 10 月

11) 和泉 自泰, 安藤 晃規, 阪本 鷹行, 光永 均, 中尾 素直, 岸野 重信, 福﨑 英一郎, 櫻谷 英治, 島 純, 小川 順, 馬場 健史
“油糧糸状菌 *Mortierella alpina* のメタボローム解析”
第 67 回日本生物工学会大会，鹿児島，2015 年 10 月

12) Hitoshi MITSUNAGA, Lena MEISSNER, Jochen BÜCHS and Eiichiro FUKUSAKI
“Branched chain amino acids inhibit the poly(γ-glutamic acid) degradation of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945”
Biotechnology and chemistry for green growth, Osaka, March, 2016

付録

表 S1. Ion-pair LC/MS/MS の MRM トランジション

Compound name	Retention time (min)	Transition	Target Q1 Pre Bias (V)	Target collision energy (V)	Target Q3 Pre Bias (V)
Serine	1.67	104.05 > 74.1	12	16	13
		164.05 > 104	17	10	12
Lysine	1.72	145.1 > 97.05	10	13	18
		145.1 > 99.05	10	17	17
Glutamine	1.72	145.1 > 127.05	12	18	18
		145.1 > 42.05	12	25	21
Threonine	1.74	118.05 > 74.05	21	16	26
		178.05 > 118	11	15	11
Proline	2.03	174.05 > 114	11	10	20
		114.05 > 68	10	15	11
Valine	2.38	176.05 > 116.05	12	10	20
		116.05 > 45	10	16	16
Cytidine	2.40	302.05 > 242	24	10	19
		242.05 > 109	19	15	20
Methionine	2.78	148.05 > 47.05	11	14	16
		148.05 > 100	11	12	18
Tyrosine	3.59	180.05 > 163.05	12	18	18
		180.05 > 119.05	12	18	21
Isoleucine	3.47	190.05 > 130.05	13	10	23
		261.1 > 130.05	18	9	22
		130.05 > 84	10	15	15
Hypoxanthine	3.65	135.05 > 92	13	28	14
		135.05 > 65	13	30	12
Leucine	3.79	190.05 > 130.05	13	10	23
		261.1 > 130.05	18	9	22
		130.05 > 84	10	15	15
Uridine	4.29	243.05 > 110.05	19	17	20
		303.05 > 243	24	10	19
Inosine	4.56	267.05 > 135.05	21	23	25
		267.05 > 108	21	42	20
Thymine	4.57	125.05 > 42	10	18	14
		185.05 > 125.05	15	10	10

Guanosine	4.61	282.1 > 150.05	23	21	29
		282.1 > 133.05	23	36	24
Phenylalanine	5.10	164.05 > 147.05	13	18	27
		164.05 > 103	13	18	19
Aspartate	5.00	132.05 > 88.05	10	14	15
		132.05 > 115	10	16	21
Glutamate	4.70	146.05 > 102.05	11	15	18
		146.05 > 128.05	11	17	24
Glucose 6-phosphate (G6P)	6.36	259.05 > 97	20	17	17
		259.05 > 79.05	20	28	27
Tryptophan	6.72	203.1 > 116.05	13	18	19
		203.1 > 74	13	18	12
Succinate semialdehyde	6.73	101.05 > 57	20	13	19
		161 > 101	10	8	15
Ribose 5-phosphate (R5P)	6.77	229.05 > 97	18	13	18
		229.05 > 79.05	18	40	27
		229.05 > 139.05	18	15	26
Lactate	6.84	89.05 > 43	20	14	15
		89.05 > 45.05	20	13	16
Sedoheptulose 7-phosphate (S7P)	6.89	289.1 > 97	20	21	16
		289.1 > 79.05	20	47	27
		289.05 > 199.05	20	13	19
Fructose 6-posphate (F6P)	6.90	259.05 > 97	20	17	17
		259.05 > 79.05	20	28	27
α-Glycerol phosphate (a-GP)	7.14	171.05 > 79.05	13	18	13
		171.05 > 97	13	18	18
Orotate	7.32	155.05 > 111.05	12	14	20
		155.05 > 42	12	26	13
Glyceraldehyde 3-phosphate (GAP)	7.35	169.05 > 97	13	12	17
		169.05 > 79.05	13	30	13
Ribulose 5-phosphate (Ru5P)	7.41	229.05 > 97	18	13	18
		229.05 > 79.05	18	40	27
		229.05 > 139.05	18	15	26
CMP	7.53	322.1 > 79.05	25	28	14
		322.1 > 97	25	22	17
Pyruvate	7.82	87.05 > 43	10	11	14
		147.05 > 87	24	9	15
Ribose 1-phosphate	7.86	229.05 > 79.05	16	25	27

(R1P)		229.05 > 211.05	16	10	22
UMP	8.00	323.1 > 79.05	26	36	13
		323.1 > 97	26	27	17
5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR)	8.05	337.1 > 79.05	12	37	26
		337.1 > 125.05	12	29	21
GMP	8.07	362.1 > 79.05	27	26	13
		362.1 > 97	27	29	17
TMP	8.60	321.1 > 195.05	25	20	22
		321.1 > 79.05	25	35	13
AMP	8.60	346.1 > 79.05	14	38	13
		346.1 > 97	14	26	17
IMP	8.61	347.05 > 79.05	25	40	28
		347.05 > 135	25	28	23
Succinate	9.58	117.05 > 73	13	15	12
		117.05 > 99.05	13	15	17
Malate	9.88	133.05 > 115	10	17	21
		133.05 > 71.05	10	15	12
XMP	9.99	363.1 > 211.05	27	20	21
		363.1 > 151.05	27	27	27
2-Oxoglutarate (2OG)	10.07	145.05 > 101.05	15	10	17
CDP	10.07	402.1 > 79.05	16	42	14
		402.1 > 159.05	16	30	30
Fumarate	10.15	115.05 > 71	13	10	12
		175.05 > 115	18	10	13
GDP	10.15	442.1 > 79.05	18	45	13, 30
		442.1 > 159.05	18	24	
6-Phospho-gluconolactone (6PGA)	10.17	275.05 > 177.05	19	16	30
		275.05 > 97	19	17	16
UDP	10.18	403.1 > 159	16	28	29
		403.1 > 79.05	16	48	14
3-Phosphoglycerate (3PG)	10.22	185.05 > 97	14	16	17
		185.05 > 79.05	14	32	13
ADP	10.36	426.1 > 79.05	17	46	13
		426.1 > 134.05	17	28	25

Fructose bisphosphate (FBP)	10.43	339.05 > 97	26	18	17
		339.05 > 241.05	26	19	27
Phosphoenolpyruvate (PEP)	10.46	167.05 > 79.05	17	15	27
		335.1 > 167.05	23	12	30
Citrate	10.49	191.05 > 87	13	18	14
		191.05 > 111.05	13	15	20
Isocitrate	10.58	191.05 > 73	13	22	26
		191.05 > 111.05	13	15	20
2-Isopropylmalate	10.62	175.05 > 115.05	13	18	21
		175.05 > 113.05	13	18	20
CTP	10.75	482.1 > 159	19	36	29
		482.1 > 79.05	19	46	13
UTP	10.87	483.1 > 159	19	36	29
		483.1 > 79.05	19	49	13
GTP	10.90	522.1 > 159	20	33	29
		522.1 > 424.05	20	23	30
ATP	10.90	506.1 > 159	20	40	29
		506.1 > 408.1	20	26	28
Phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP)	11.03	389.1 > 177.05	28	21	30
		389.1 > 291.05	28	14	30
1,3-Bisphosphoglycerate (BPG)	11.03	265.05 > 167.05	20	18	29
		265.05 > 79.05	20	48	13
Succinyl CoA (Suc-CoA)	11.15	866.1 > 408.1	30	44	25
		866.1 > 786.1	30	40	24
Acetyl CoA (Ace-CoA)	11.17	808.1 > 408.1	20	37	28
		808.1 > 159.05	20	30	27
(+)-10-Camphorsulfonate	11.18	231.1 > 80	10	32	30