The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	出芽酵母の代謝解析とその応用による有用物質生産性向上に関する研究
Author(s)	早川, 謙嗣
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61861
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

出芽酵母の代謝解析とその応用による
有用物質生産性向上に関する研究

提出先　　大阪大学大学院情報科学研究科

提出年月　2017 年 1 月

早 川　謙 嗣

学位取得に関わる発表論文

学術雑誌

[1] Kenshi Hayakawa, Shuichi Kajihata, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, "^{13}C-metabolic flux analysis in *S*-adenosyl-L-methionine production by *Saccharomyces cerevisiae*", Journal of Bioscience and Bioengineering, 120, 532–538, 2015 (博士論文第 2 章)

[2] Kenshi Hayakawa, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, "Metabolome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* and optimization of culture medium for *S*-adenosyl-L-methionine production", AMB Express, 6: 38, 2016 (博士論文第 4 章)

国際会議

[1] Kenshi Hayakawa, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, "^{13}C-metabolic flux analysis of ethanol-assimilating *Saccharomyces cerevisiae* for *S*-adenosyl-L-methionine production", Metabolic Engineering 11, Poster Session 3, Poster number 8, Awaji, Japan, June 26–30, 2016 (博士論文第 3 章)

[2] Kenshi Hayakawa, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, "Metabolome Analysis of S-Adenosyl-L-methionine Production By *Saccharomyces Cerevisiae*", International Conference on Biomolecular Engineering, Poster number 12, Singapore, Jan 5–7, 2016 (博士論文第 4 章)

特許出願

早川 謙嗣, 清水 浩, "微生物による（S）−アデノシル−L−メチオニンの製造方法", 公開番号 P2015-163054A, 公開日 2015 年 9 月 10 日

内容梗概

出芽酵母は、飲料、食品や *S*-アデノシル-L-メチオニン (SAM) 等の多数の有用物質の工業生産に用いられている微生物である。出芽酵母を用いた物質生産における生産性向上には、原料となる炭素源から目的物質への代謝物の流れが増加するように細胞内の代謝状態を改変することが求められる。そのためには、代謝状態の評価と、それに基づいた代謝改変戦略の提案が重要と考えられる。本研究で目的物質とした SAM 生産については、清酒酵母の SAM 高生産能力、エタノール資化による SAM 含量増加、L-メチオニン添加による SAM 生産性向上が報告されているが、代謝改変に向けての必要な知見は得られていない。そこで、本研究では、SAM 生産出芽酵母の代謝解析によって、(i) SAM 高生産能力に関連する代謝経路、(ii) エタノール資化による SAM 含量増加に関連する代謝経路、(iii) SAM 生産の律速段階 (ボトルネック) を探索し、解析結果から SAM 生産性向上および出芽酵母を用いた物質生産に向けた知見を抽出することを目的とした。

本学位論文は、第 1 章から第 5 章より構成される。

第 1 章では、本研究の背景と目的を記述した。

第 2 章では、SAM 生産能力と、SAM 前駆体、NADPH および ATP 供給量の関連について調べた。^{13}C 代謝フラックス解析 (^{13}C-MFA) を用いて、グルコース資化における対照株・実験室酵母 S288C 株と SAM 高生産株・清酒酵母協会 6 号の中央代謝の代謝フラックス分布を推定し、中央代謝からの SAM 前駆体、NADPH と ATP 供給量を算出した。SAM 高生産株では、TCA 回路フラックスと酸化的リン酸化活性が高く、ATP 再生能が向上していた。酸化的リン酸化では酸素を必要とすることから、SAM 生産性向上には、高 TCA 回路フラックスと高呼吸活性による ATP 供給量増加が重要と考えられた。

第 3 章では、エタノール資化による SAM 含量増加と代謝状態の関連について調べた。^{13}C-MFA を用いて、SAM 高生産株のエタノール資化における中央代謝の代謝フラックス分布を推定した。第 2 章で示したグルコースと異なり、エタノール資化ではグリオキシル酸経路が活性化し、ペントースリン酸経路には、ほとんど炭素が流れていないことが分かった。さらに、エタノール資化ではグルコースより TCA 回路フラックスと酸化的リン酸化活性が高く、多くの過剰な ATP を供給していた。SAM 生産性向上には、エタノール資化による ATP 供給量増加が重要と考えられた。また、エタノール資化は、グルコースと比較して CO_2 の炭素収率が高く、その多くは TCA 回路で生成していた。CO_2 生成量抑制には、TCA 回路を迂回するグリオキシル酸経路のフラックス増加が重要と示唆された。

第 4 章では、SAM 生産におけるボトルネックを探索し、ボトルネック解消による SAM 生産性向上を検証した。SAM 生産性が異なる培養条件の細胞内代謝物濃度の定

量と多変量解析によるデータ解析によって、細胞内で蓄積または欠乏している代謝物を抽出した。SAM 高生産株は対照株より細胞内 ATP 濃度が高く、L-メチオニンを用いた高生産条件では、ATP とその前駆体の細胞内濃度が低下していた。そこで、細胞増殖に使用される ATP 量を削減するため酵母エキス未含有培地で培養したところ、初期条件 (5.0 g L^{-1}) 培地と比較して細胞濃度が減少する一方、細胞内 ATP 濃度が増加し、SAM 生産量も 1.6 倍増加した。SAM 生産性向上には、L-メチオニン以外に ATP 供給量増加も関与し、増殖活性低下等の細胞内 ATP 消費の効率化が有効と考えられた。また、L-メチオニンを用いた条件ではメチオニンサルベージ経路中間体の細胞内濃度が増加していたことから、SAM 分解抑制には当経路フラックスの低下が重要と示唆された。

第 5 章では、本研究で得られた知見をまとめ、SAM 生産性向上に向けた戦略や出芽酵母を用いた、その他の有用物質生産性向上に代謝解析を活用する方法論について議論した。

目次

第 1 章　緒論 1
1. 1.　出芽酵母によるファインケミカルの物質生産 1
1. 2.　出芽酵母による *S*-アデノシル-L-メチオニン生産と課題 3
1. 3.　代謝解析技術を用いた代謝の評価 7
1. 3. 1.　^{13}C 代謝フラックス解析 7
1. 3. 2.　メタボローム解析 9
1. 4.　本論文の目的と構成 11
第 2 章　*S*-アデノシル-L-メチオニン生産能力の異なる出芽酵母の ^{13}C 代謝フラックス解析 13
2. 1.　Highlights 13
2. 2.　緒言 14
2. 3.　実験材料と実験方法 15
2. 3. 1.　使用菌株 15
2. 3. 2.　SAM 生産能力の確認 15
2. 3. 3.　^{13}C-MFA 培養条件 15
2. 3. 4.　オフライン測定 16
2. 3. 5.　タンパク質由来アミノ酸 GC-MS 分析 16
2. 3. 6.　代謝ネットワークモデル 17
2. 3. 7.　^{13}C 代謝フラックス解析 20
2. 3. 8.　細胞増殖と SAM 生合成に必要な NADPH と ATP 量の算出 21
2. 4.　実験結果 24
2. 4. 1.　各出芽酵母における SAM 生産能力の確認 24
2. 4. 2.　^{13}C 代謝フラックス解析 (^{13}C-MFA) 24
2. 4. 3.　酸化還元バランス 32
2. 4. 4.　ATP バランス 32
2. 5.　考察 35
第 3 章　*S*-アデノシル-L-メチオニン生産出芽酵母のエタノール資化における ^{13}C 代謝フラックス解析 38
3. 1.　Highlights 38
3. 2.　緒言 39
3. 3.　実験材料と実験方法 41
3. 3. 1.　使用菌株 41
3. 3. 2.　^{13}C-MFA 培養条件 41

3. 3. 3.　オフライン測定 41
3. 3. 4.　タンパク質由来アミノ酸 GC-MS 分析 41
3. 3. 5.　代謝ネットワークモデル 42
3. 3. 6.　^{13}C 代謝フラックス解析 42
3. 3. 7.　細胞増殖と SAM 生合成に必要な NADPH と ATP 量の算出 42
3. 3. 8.　フラックスバランス解析 (FBA) 45
3. 4.　実験結果 46
3. 4. 1.　^{13}C 代謝フラックス解析 (^{13}C-MFA) 46
3. 4. 2.　酸化還元バランス 53
3. 4. 3.　ATP バランス 53
3. 4. 4.　フラックスバランス解析 (FBA) 55
3. 5.　考察 57
第 4 章　出芽酵母のメタボローム解析と *S*-アデノシル-L-メチオニン生産培地組成の最適化 59
4. 1.　Highlights 59
4. 2.　緒言 60
4. 3.　実験材料と実験方法 61
4. 3. 1.　使用菌株 61
4. 3. 2.　培養方法 61
4. 3. 3.　オフライン測定 61
4. 3. 4.　メタボローム解析 61
4. 4.　実験結果 63
4. 4. 1.　SAM 生産における培養条件の影響 63
4. 4. 2.　細胞内代謝物濃度に及ぼす L-メチオニンの効果 63
4. 4. 3.　SAM 高生産株と実験室株の細胞内代謝物濃度の比較 66
4. 4. 4.　SAM 生産に及ぼす細胞内 ATP 濃度の効果 69
4. 5.　考察 71
第 5 章　結論と展望 73
5. 1.　結果のまとめ 73
5. 2.　本研究の寄与 78
5. 3.　今後の展望 80
参考文献 82
Appendix 93
謝辞 111

第 1 章　緒論

1. 1. 出芽酵母によるファインケミカルの物質生産

医薬品、化粧品、サプリメント、香料あるいは食品添加物等の原料となるファインケミカルの生産には微生物が用いられている。微生物による生産方法では、安価な炭素、窒素、微量元素とエネルギーの各原料から、生産宿主の増殖および生産物の合成に必要な化合物を供給することが可能である (Johnson and Schmidt-Dannert 2008)。微生物によって培養生産されるアミノ酸、ビタミン類、酵素や抗生物質等のファインケミカルの 2013 年における世界市場規模は約 220 億米ドルと推定されており、重要な産業となっている (Bio-Based Chemicals: Value Added Products from Biorefineries, IEA Bioenergy, 2013)。また、全世界で 240 億米ドル規模の香水や食用香料の市場に (2013 年の推定値、Carlquist et al. 2015)、培養生産製品が徐々に参入している (Fletcher et al. 2016)。

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) はファインケミカルの工業生産宿主として用いられている。化粧品原料としても利用されるファルネセンは、出芽酵母を用いて年間 40−50 百万リットル生産されている。抗酸化物質レスベラトロールはサプリメントとしての米国市場規模が 4,400 万米ドル (2014 年、Nutrition Business Journal 2015 Supplement Business Report) であり、出芽酵母を用いて生産されている (Borodina and Nielsen 2014)。サプリメントとして利用されるグルタチオン (Patzschke et al. 2015) や *S*-アデノシル-L-メチオニン (Shiozaki et al. 1986)、マラリア治療薬アルテミシニン (Ro et al. 2006) も同様である。香料バニリン (年間生産量 16,000 トン程度) や甘味料ステビアも出芽酵母による工業生産が検討されている (Brochado et al. 2010; Fletcher et al. 2016)。また、医薬品原料となるアルカロイドについては、出芽酵母における生産経路の構築が報告されている (Brown et al. 2015; Galanie et al. 2015)。

出芽酵母は、古くからビール、ワイン、日本酒などの醸造やパン製造などに利用されてきた微生物である。また、バイオエタノール、ワクチン、医薬用タンパク質 (インスリン)、機能性食品の生産においても広く用いられてきた。さらには、砂糖あるいはスターチ由来のグルコースやフルクトース、未利用バイオマス等を原料としたバイオ燃料 (イソブタノール) や化学製品 (乳酸、コハク酸、イソプレノイド) など、多岐にわたる有用物質の生産にも使用されており、cell factory (細胞工場) の宿主としての活用が期待されている (Fletcher et al. 2016; Hasunuma and Kondo 2008; Nevoigt 2008; Nielsen and Jewett 2008)。出芽酵母は非病原性の真核単細胞生物で米国食品医薬品局 (FDA) から GRAS (generally regarder as safe) 生物として分類されている (Ostergaad et al. 2000)。高い増殖速度を示し、高温条件に対する耐性を有する。また、低 pH や高糖濃度といった培養ストレスに対する頑強性を持つことから、培養生産中での他の微生物の混入 (コンタミネーション) リスクが少ないと考えられている。さらに、遺伝子操作が容易で、生

理学、生化学、遺伝学あるいは大スケール培養技術についての豊富な知見が利用可能である。これらの理由により、出芽酵母は工業的培養生産でよく用いられており、さらに、新規生産プロセス開発においても、宿主として選ばれることが多い (Nielsen and Jewett 2008)。出芽酵母を用いた物質生産は、再生可能原料を用いる持続可能な物質生産プロセスとして期待されており、さらなる効率化が求められている。

コスト競争力のある培養生産プロセスを構築するためには、生産量、速度や収率の向上が必要であり、出芽酵母細胞内における、原料となるグルコース等の炭素源から目的物質への代謝物の流れを増加させることが課題となる。しかし、従来行われてきた、個々の代謝反応に関わる遺伝子および酵素、あるいは細胞外 (培養液) の代謝物を対象とした解析では、この代謝物の流れを直接的に把握することは困難であった。そのため、細胞内の代謝物の流れを評価する技術の適用と方法論の確立が重要と考えられる。

1. 2. 出芽酵母による *S*-アデノシル-L-メチオニン生産と課題

S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) は、生体内でタンパク質、DNA あるいはリン脂質へのメチル基供与体として作用する代謝物である (Chiang et al. 1996)。また、うつ病 (Saletu et al. 2002)、アルツハイマー病 (Morrison et al. 1996)、アルコール性肝臓疾患 (Lieber 2002)、AIDS (Shippy et al. 2004) や骨関節炎 (Bradley et al. 1994) に対する効果が知られている。構造式を Fig 1-1 に示す。米国では 1999 年からサプリメントとして、欧州では 1979 年から医薬品として利用されている (Shobayasi et al. 2006)。米国においては、2014 年度の市場規模が 1.25 億米ドルで、今後も年 1−2% の成長が予測されている (Fig. 1-2)。日本では、「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」に掲載されており、医薬品原料として扱われている。一方で、2009 年に厚生労働省において、SAM が天然に含有する酵母等の食品につき、栄養成分表示等で SAM を記載すること自体に問題がないという見解が示されたことにより、今後の市場拡大が期待されている (P2011-177125A. 2011)。

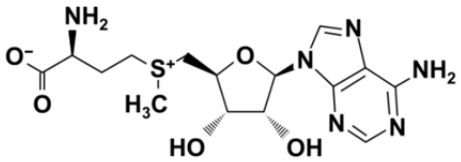


Fig. 1-1 SAM 構造式

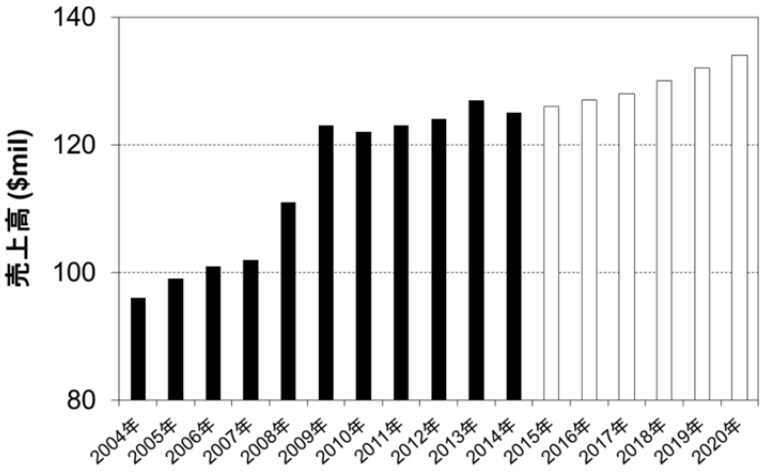


Fig. 1-2 SAM 市場規模 (米国)

Nutrition Business Journal 2015 Supplement Business Report をもとに作成した。2014 年までは実績値、2015 年以降は予測値を表している。

SAM 生産方法として、化学合成による方法 (Matos et al. 1987)、微生物から単離精製した SAM 合成酵素を用いて、L-メチオニンと ATP を基質として合成する方法 (Markham et al. 1980) および微生物を用いて培養生産する方法 (Shiozaki et al. 1986) が知られている。化学合成法は、生産性が低く、厳密な反応条件が必要で分離精製が難しいことが課題である (Chu et al. 2013)。酵素合成法は、SAM 合成酵素の単離精製が困難で、高価な ATP を基質とする必要がある (Schlenk and Depalma 1957)。そのため、SAM 工業生産は主に微生物培養によって行われている。出芽酵母は、その高い細胞内 SAM 含量から工業生産の宿主として用いられている (Huang et al. 2012; Shiozaki et al. 1984)。出芽酵母では、SAM は methionine adenosyltransferase により L-メチオニンと ATP から合成される。生体内でメチル基供与体として作用したのち、メチオニンサルベージ経路を通って *S*-アデノシルホモシステインから L-メチオニンへ再合成される (Fig. 1-3)。また、SAM 生合成関連酵素は細胞質に局在することから、出芽酵母では SAM は細胞質で生合成されると考えられている (Breker et al. 2013; Tkach et al. 2012)。

これまでに SAM 生産性向上の取り組みとして、高生産酵母のスクリーニング、変異原あるいは遺伝子組換え技術を用いた育種や培養生産条件の最適化が検討されてきた。約 300 種類の微生物を対象としたスクリーニングでは、清酒酵母、特に協会 6 号が最も高い SAM 生産量・細胞内含量を示したことが報告されている (Shiozaki et al. 1984)。エルゴステロール合成欠損のナイスタチン耐性変異株では対照株の 3 倍以上の

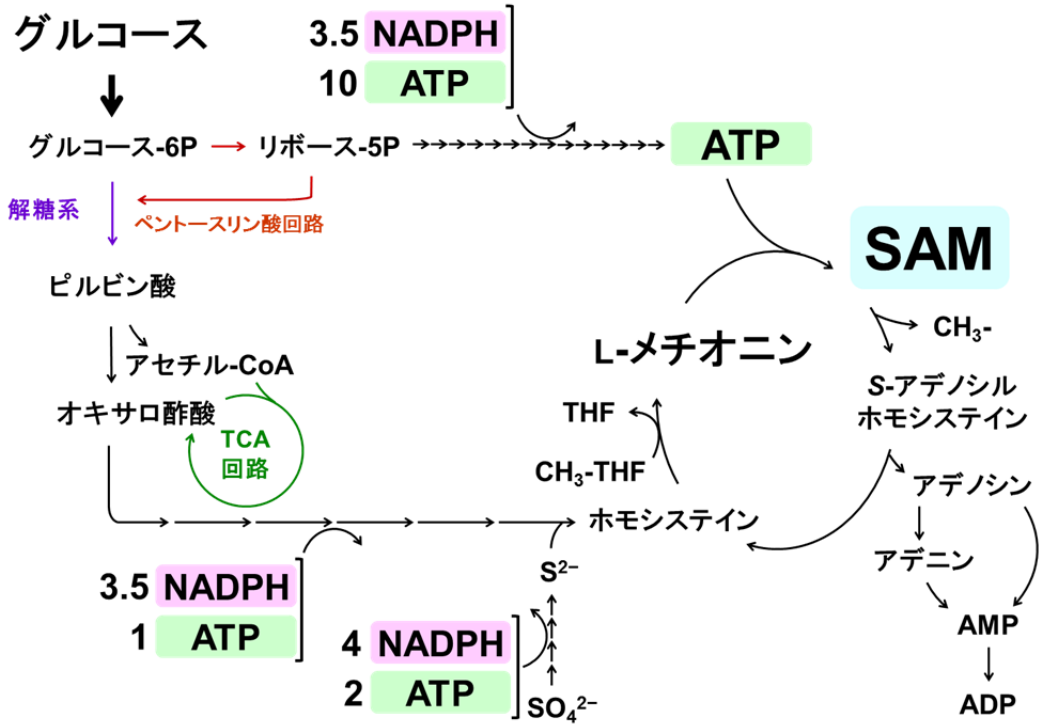


Fig. 1-3 中央代謝系と SAM 生合成経路

生産量で、含量は 70 mg [g cell dry weight (CDW)]$^{-1}$ に達した (Shobayashi et al. 2006)。エチオニン耐性遺伝子増強株の SAM 含量は対照株の 20 倍以上となった (Shiomi et al. 1990)。メチオニンサルベージ経路の adenosine kinase (*ADO1*) 破壊株の含量は 18 mg g CDW^{-1} となり、対照株の 30 倍に向上した (Kanai et al. 2013)。Methionie synthase (*MET6*) と methionine adenosyltransferase (*SAM2*) の共発現株の SAM 生産量は対照株の 2 倍以上となった (Chen et al. 2016)。培地への L-メチオニン添加も、SAM 生産性向上に対して効果的な手法である (Shiozaki et al. 1984; Shiozaki et al. 1986; Shobayashi et al. 2007a)。一方で、過剰量の L-メチオニン添加は、methionine adenosyltransferase 遺伝子の転写を抑制することから、SAM 生産収率を低下させると考えられている (He et al. 2006)。培養中にエタノールを添加すると SAM 含量が向上し、5 日間の培養で生産量が 10.8 g L^{-1} となった (Shiozaki et al. 1986; Shiozaki et al. 1989)。また、実用研究においては、4 日間の培養の SAM 含量が 120 mg g CDW^{-1} (WO2010/027014 A1. 2010) や、6 日間の培養で生産量が 7.2 g L^{-1} (培養液比重を 1 と仮定) で含量が 205 mg g CDW^{-1} (P4479932. 2010) に達した結果が報告されている。これらの先行研究から実用化に向けた知見を見出すことが必要となる。

出芽酵母を用いた SAM 高生産条件として、清酒酵母を宿主とし、エタノールや L-メチオニンを添加することが明らかとなっている。しかしながら、清酒酵母の SAM 高生産能力やエタノール資化による SAM 含量増加に関連する代謝経路、あるいは SAM 生産の律速段階 (ボトルネック) については不明である。SAM 高生産には生産株の細胞内代謝を改変していく必要があり、これらの経路はそのための重要な知見となる。また、Fig 1-3 に示した中央代謝系と SAM 生合成経路の中に存在すると予想できるため、適切な方法によって見出すことが必要である。以下に詳細を示す。各解析技術については次節で述べる。

<u>SAM 生産性向上に求められる知見</u>

1. 清酒酵母の SAM 高生産能力に関連する代謝経路

SAM 高生産株では SAM 前駆体、エネルギー分子 (ATP) や還元力 (NADPH) 供給速度が高いことが予測される。そのため、清酒酵母と実験室酵母 (低生産株) における各代謝反応の反応速度を比較する必要がある。清酒酵母のほうが反応速度の高い代謝反応が SAM 高生産に関連すると推定される。複数の代謝反応速度 (代謝フラックス) を同時に定量的に把握する必要があり、その手段として、^{13}C 代謝フラックス解析技術が最も適していると考えられる。

2. エタノール資化による SAM 含量増加に関連する代謝経路

エタノールを資化することによって、グルコース資化時と大きく代謝状態が変化すると考えられる。そのため、代謝反応速度 (代謝フラックス) レベルでの解析が必要である。エタノール資化条件で高い反応速度を示す代謝反応が SAM 高生産に関連すると

推定される。複数の代謝反応速度 (代謝フラックス) を同時に定量的に把握する必要があり、その手段として、^{13}C 代謝フラックス解析技術が最も適していると考えられる。

3. SAM 生産の律速段階 (ボトルネック)

律速段階 (ボトルネック) では基質となる代謝物が蓄積していると予測される。SAM 生産性が異なる培養条件で各代謝物の細胞内濃度を比較し、SAM 高生産条件において濃度が高い代謝物を基質とする代謝反応を探索する必要がある。Fig 1-3 で示した代謝経路を構成する代謝物は極性を持つものが多く、これらを網羅的に定量するためには、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) によるメタボローム解析技術が最も適していると考えられる。

一方で、温度や培地 pH 等の培養条件も出芽酵母の細胞内代謝に関与する要因として挙げられる。本研究では、出芽酵母の増殖および培養生産に適している温度 (25−35 °C) と pH (5.0−6.0) (原島ら. 2013) 等の高細胞収率が期待できる培養条件における代謝状態に着目する。代謝フラックスや細胞内代謝物濃度は、遺伝子発現量、酵素の細胞内濃度および活性等を含む複雑な制御機構の結果として生じる表現型である (Nugroho et al. 2015; Toya et al. 2010)。実験室酵母と清酒酵母の代謝フラックスの比較解析を行うことで、遺伝子やタンパク質の発現量の比較解析では得られない代謝の流れの大きさを定量化し、異なる SAM 生産収率の細胞株に対して、直接、反応速度のレベルで違いを観測することができる。従って、異なる株間で代謝フラックスを解析、比較することで、どの代謝経路がどれだけ異なるかを理解することができ、収率の改良にとって重要な戦略を立案できると考えられる。

また、SAM 生産性を議論するためには、培養系の生産量も重要な指標となる。出芽酵母を用いた物質生産では、バイオエタノールのように大スケールの培養生産系による大量生産が可能である (Nielsen and Jewett 2008)。また、SAM 生産においても試験管レベルから培養槽までのスケールアップや実用生産研究が報告されていることから (Shiozaki et al. 1986; WO2010/027014 A1. 2010; P4479932. 2010)、細胞あたりの生産速度および収率を維持し、培養系内の細胞量を増加させることによる生産量向上を期待できる。本研究では代謝フラックス (代謝反応速度) レベルでの解析を行うことで、SAM 生産能力を生産速度として評価する。

1. 3. 代謝解析技術を用いた代謝の評価

代謝とは、細胞が外部から取り込んだ有機物や無機物からエネルギーを取り出し、増殖に必要な化合物を合成する過程である。また、微生物を用いた有用物質生産においては生産過程とも考えることができるため、生産性向上には代謝の評価と、それに基づいた改変が必要と考えられる。細胞内の代謝状態を定量的に評価するためには、代謝ネットワーク情報を取り出すための分析技術と、大量のデータを高度に解析する情報科学技術を駆使して、複雑な代謝ネットワーク構造を詳細に調べることが求められる。代謝はゲノム配列や細胞内酵素濃度によっても影響を受けるが、SAM 生産性向上に必要な情報を得るためには、代謝状態を直接表している代謝反応速度 (代謝物の流れ) や細胞内代謝物濃度を評価する方が効果的と考えられる (Fig 1-4)。そこで本研究では、(i) 各代謝経路の反応速度を推定するために、炭素原子の安定同位体 (^{13}C) で標識した化合物の取り込み実験に基づく代謝フラックス解析 (^{13}C-MFA) 技術と、(ii) 細胞内の代謝物濃度を網羅的に定量するためにメタボローム解析技術の適用を試みた。以下でこれらの技術概要を述べる。

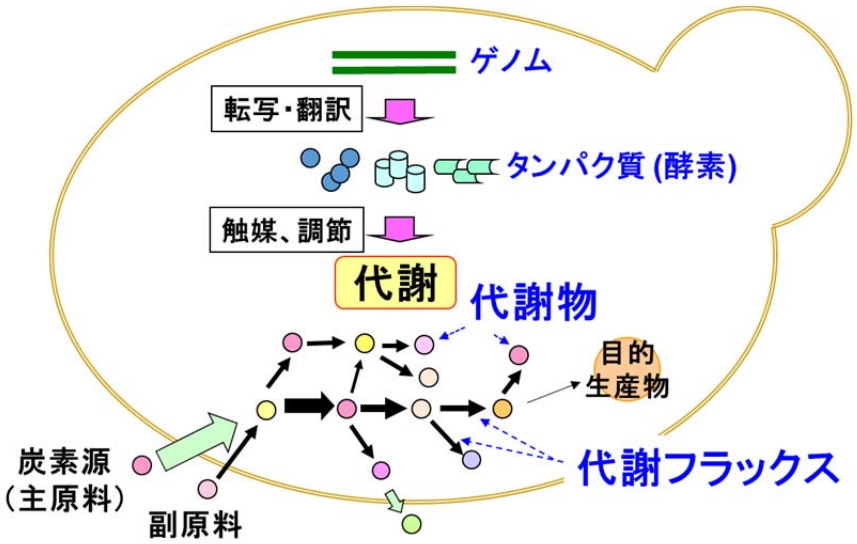


Fig. 1-4 細胞内の情報階層

1. 3. 1. ^{13}C 代謝フラックス解析

代謝状態を定量的に把握する指標として、細胞乾燥重量あたりの代謝反応速度 (単位 : mmol g CDW^{-1} h^{-1}) で定義される代謝フラックスがある。代謝フラックスの測定により、細胞内の複雑な代謝反応ネットワークにおける代謝物の流れの理解と、微生物に

よる有用物質生産性向上に対する明確な代謝改変戦略を与えるものと期待されている (Antoniewicz et al. 2007; Wittmann and Heinzle, 2002)。直接測定することができない細胞内代謝フラックス分布を推定する方法として、^{13}C-MFA が用いられる (Wiechert 2001)。^{13}C で標識した炭素源を微生物に取り込ませ、代謝物中の ^{13}C 濃縮度を測定し、得られた ^{13}C 濃縮度データを最もよく説明する代謝フラックスを計算機処理で推定する技術である。^{13}C-MFA によって、細胞内代謝経路の活性を把握することができ、そこから細胞内の酸化還元バランスあるいはエネルギー状態についても議論が可能となる。それゆえ、目的物質生産能力が異なる細胞株あるいは生産性・生産収率が異なる培養条件間における、代謝フラックス分布や目的物質生合成に必要な還元力 (NADPH) とエネルギー分子 (ATP) 供給量および消費量の比較をもとに、物質生産性に関与している代謝経路を探索することで、高生産株育種や培養条件改良戦略に活用できると考えられる。

^{13}C-MFA は、細胞の比増殖速度が一定で、代謝の定常状態を作り出すことが可能な連続培養系や回分培養の対数増殖期で行う。代謝が定常な状態で培養を続けると、細胞内代謝物 の ^{13}C 濃縮度も定常となり、その時の代謝状態を反映していると考えられる。一方で、代謝状態が変化すると、^{13}C 濃縮度は複数の代謝状態の結果を表したものとなるため、当該データをもとにした代謝フラックス分布の推定ができなくなる。

代謝フラックス分布の推定に使用する ^{13}C 濃縮度の測定対象として、細胞内に大量に存在するタンパク質由来アミノ酸がある。アミノ酸は中央代謝の様々な中間代謝物を前駆体として合成されるため、その ^{13}C 濃縮度から中央代謝の代謝フラックス分布に関する情報の取得が可能である。^{13}C 濃縮度の測定には、質量分析計 (MS) や核磁気共鳴装置 (NMR) が使用できる。この情報を用いて物質収支式や各代謝物の ^{13}C 濃縮度の収支式を解くことで代謝フラックスを推定する。^{13}C-MFA で推定した代謝フラックス分布は、代謝モデルを構成する代謝反応に大きく依存するため、遺伝子発現や酵素活性などの生物学的な知見に基づいた代謝モデルの設定が必要である。また、^{13}C 標識培養実験で用いる炭素源の ^{13}C 標識パターンも、代謝フラックス分布の推定結果に大きく影響する (Leighty and Antoniewicz 2012)。そのため、計算機シミュレーションにより、精度の高い代謝フラックス分布の推定に適した炭素源 ^{13}C 標識パターンを導出する手法が提案されている (Maeda et al. 2016)。

出芽酵母では、グルコースを炭素源として、^{13}C-MFA を用いて推定した代謝フラックス分布が数多く報告されている (Frick and Wittmann 2005; Gombert et al. 2001; Jouhten et al. 2008; Wang and Hatzimanikatis 2006)。C2 炭素源では、*Escherichia coli* (Zhao et al. 2004) や *Geobacter metallireducens* (Tang et al. 2007) で酢酸を資化したときの代謝フラックス分布を推定した報告が存在するが、^{13}C-MFA を用いてエタノール資化における代謝フラックス分布を推定した結果は報告されていない。それゆえ、推定したエタノール資化における代謝フラックス分布に対しては、遺伝子あるいはタンパク質発現レベル

の知見やグルコース資化での代謝フラックス解析結果をもとにした考察が必要と考えられる。

微生物による様々な有用物質生産に関する研究で ^{13}C-MFA を用いて代謝機構を解析している。出芽酵母を用いた 3-ヒドロキシプロピオン酸 (3HP) 生産では、高生産株と低生産株の代謝フラックス分布を比較することで、高生産株では 3HP 合成経路に存在するピルビン酸から酢酸への変換が制限されていると示した (Kildegaard et al. 2016)。また、シキミ酸等の芳香族代謝物生産では、エリトロース-4-リン酸の利用効率が向上する代謝改変が重要と示された (Suástegui et al. 2016)。*Corynebacterium glutamicum* では、細胞増殖期とグルタミン酸生産期のそれぞれで ^{13}C-MFA を行うことで、グルタミン酸生産に最も重要な補充経路として pyruvate carboxylase によるオキサロ酢酸からピルビン酸を生成する反応と示した (Shirai et al. 2007)。また、L-バリン生産では、バリン合成に要求される NADPH はペントースリン酸経路から供給されることを示した。さらに、CO_2 発生を伴わずに NADPH を供給する反応 (transhydrogenase により NADH から NADPH を生成する反応) を導入することで、ペントースリン酸経路からの CO_2 の排出を抑制し、L-バリン収率を向上させた (Bartek et al. 2011)。このように、代謝フラックス分布の推定によって、代謝改変や培養条件改良の方針を得ることが期待できる。

1. 3. 2. メタボローム解析

メタボローム解析技術は、細胞内に存在する代謝物の網羅的な定量分析に有効な手段である。多くの場合、代謝物は細胞内制御機構の最終産物であり、細胞内における代謝物蓄積量は遺伝的あるいは周辺環境の変化に対する細胞システムの最終応答として考えることができる。メタボローム解析結果を用いて、細胞内代謝ネットワーク制御に重要な分岐点の特定や、遺伝子や転写産物、タンパク質の存在量といった細胞機能の評価が可能である。また、有用物質生産微生物の細胞内代謝状態を把握することにより、代謝ネットワークにおける律速部位の特定が期待されている (Toya and Shimizu 2013)。

メタボローム解析は、1) 細胞内反応停止、抽出と濃縮の各過程を含む測定試料の調製、2) 定性あるいは定量分析、3) データ解析、の 3 段階からなる (Reaves and Rabinowitz 2011)。酵素反応の停止、培養液と細胞の分離、細胞からの代謝物の抽出は迅速に行う必要がある (Bolten et al. 2007)。抽出した代謝物は、MS や NMR 等で検出する。MS については、より高感度の飛行時間型 MS (TOFMS) やタンデム MS (MS/MS) も用いられている。MS は、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動 (CE) と組み合わせて使用することが多い (Bergdahl et al. 2012; Mimura et al 2014; Soga et al. 2003)。分析対象とする代謝物の種類や個数、必要な測定精度によって測定方法を選択する必要がある。CE-TOFMS は水溶性あるいはイオン性の高い化合物の測定に適しており、糖リン酸、ヌクレオチド、アミノ酸、有機酸等の代謝物を目的物質としたメタボローム解析に使用されている (Ohashi et al. 2008; Soga

et al. 2006)。CE-TOFMS を用いたメタボローム解析技術によって出芽酵母のストレス耐性などの細胞内代謝状態や、制御機構に関連する代謝物と代謝反応が調べられている (Hasunuma et al. 2011; Matsushika et al. 2013; Nugroho et al. 2015; Shirai et al. 2013)。メタボローム解析では膨大な量のデータが得られる。そのため、データの特性を調査し、データが含んでいる情報を整理するために、主成分分析やクラスター分析等の多変量解析が用いられる。

メタボローム解析も、微生物による様々な有用物質生産に関する研究で用いられている。出芽酵母のエタノール生産において重要な形質となるエタノール耐性に寄与する代謝物として、トレハロース、プロリン、バリンやイノシトールを特定した (Ohta et al. 2016)。*E. coli* を用いた L-チロシン生産では、律速段階の 1 つとして quinate/shikimate dehydrogenase による反応を特定した (Juminaga et al. 2012)。また、*C. glutamicum* を用いたシキミ酸生産では、解糖系の律速段階を glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase による反応と特定し、当酵素を過剰発現することで、グルコース消費量とシキミ酸生産量が増加した (Kogure et al. 2016)。これらの結果が示すように、メタボローム解析によって、物質生産の律速段階や生産性に関与する代謝物を探索することが可能と考えられる。

1. 4. 本論文の目的と構成

出芽酵母は、飲料、食品や SAM 等の多数の有用物質の工業生産に用いられている微生物である。出芽酵母を用いた物質生産における生産性向上には、原料となる炭素源から目的物質への代謝物の流れが増加するように細胞内の代謝状態を改変することが求められる。そのためには、代謝状態の評価と、それに基づいた代謝改変戦略の提案が重要と考えられる。SAM 生産については、清酒酵母の SAM 高生産能力、エタノール資化による SAM 含量増加、L-メチオニン添加による SAM 生産性向上が報告されているが、代謝改変に向けての必要な知見は得られていない。そこで、本研究では、SAM 生産出芽酵母の代謝解析によって、(i) SAM 高生産能力に関連する代謝経路、(ii) エタノール資化による SAM 含量増加に関連する代謝経路、(iii) SAM 生産の律速段階 (ボトルネック) を探索し、解析結果から SAM 生産性向上および出芽酵母を用いた物質生産に向けた知見を抽出することを目的とする。

本学位論文は、第 1 章から第 5 章より構成される。概要を Fig. 1-5 に示す。

第 1 章では、本研究の背景と目的を記述した。

第 2 章では、SAM 生産能力と、SAM 前駆体、NADPH および ATP 供給量の関連について調べた。^{13}C-MFA を用いて、グルコース資化における対照株・実験室酵母 S288C 株と SAM 高生産株・清酒酵母協会 6 号の中央代謝の代謝フラックス分布を推定し、中央代謝からの SAM 前駆体、NADPH と ATP 供給量を算出した。SAM 高生産株では、TCA 回路フラックスと酸化的リン酸化活性が高く、ATP 再生能が向上していた。酸化的リン酸化では酸素を必要とすることから、SAM 生産性向上には、高 TCA 回路フラックスと高呼吸活性による ATP 供給量増加が重要と考えられた。

第 3 章では、エタノール資化による SAM 含量増加と代謝状態の関連について調べた。^{13}C-MFA を用いて、SAM 高生産株のエタノール資化における中央代謝の代謝フラックス分布を推定した。第 2 章で示したグルコースと異なり、エタノール資化ではグリオキシル酸経路が活性化し、ペントースリン酸経路には、ほとんど炭素が流れていないことが分かった。さらに、エタノール資化ではグルコースより TCA 回路フラックスと酸化的リン酸化活性が高く、多くの過剰な ATP を供給していた。SAM 生産性向上には、エタノール資化による ATP 供給量増加が重要と考えられた。また、エタノール資化は、グルコースと比較して CO_2 の炭素収率が高く、その多くは TCA 回路で生成していた。CO_2 生成量抑制には、TCA 回路を迂回するグリオキシル酸経路のフラックス増加が重要と示唆された。

第 4 章では、SAM 生産におけるボトルネックを探索し、ボトルネック解消による SAM 生産性向上を検証した。SAM 生産性が異なる培養条件の細胞内代謝物濃度の定量と多変量解析によるデータ解析によって、細胞内で蓄積または欠乏している代謝物を抽出した。SAM 高生産株は対照株より細胞内 ATP 濃度が高く、L-メチオニンを用い

た高生産条件では、ATP とその前駆体の細胞内濃度が低下していた。そこで、細胞増殖に使用される ATP 量を削減するため酵母エキス未含有培地で培養したところ、初期条件 (5.0 g L^{-1}) 培地と比較して細胞濃度が減少する一方、細胞内 ATP 濃度が増加し、SAM 生産量も 1.6 倍増加した。SAM 生産性向上には、L-メチオニン以外に ATP 供給量増加も関与し、増殖活性低下等の細胞内 ATP 消費の効率化が有効と考えられた。また、L-メチオニンを用いた条件ではメチオニンサルベージ経路中間体の細胞内濃度が増加していたことから、SAM 分解抑制には当経路フラックスの低下が重要と示唆された。

第 5 章では、本研究で得られた知見をまとめ、SAM 生産性向上に向けた戦略や出芽酵母を用いた、その他の有用物質生産性向上に代謝解析を活用する方法論について議論した。

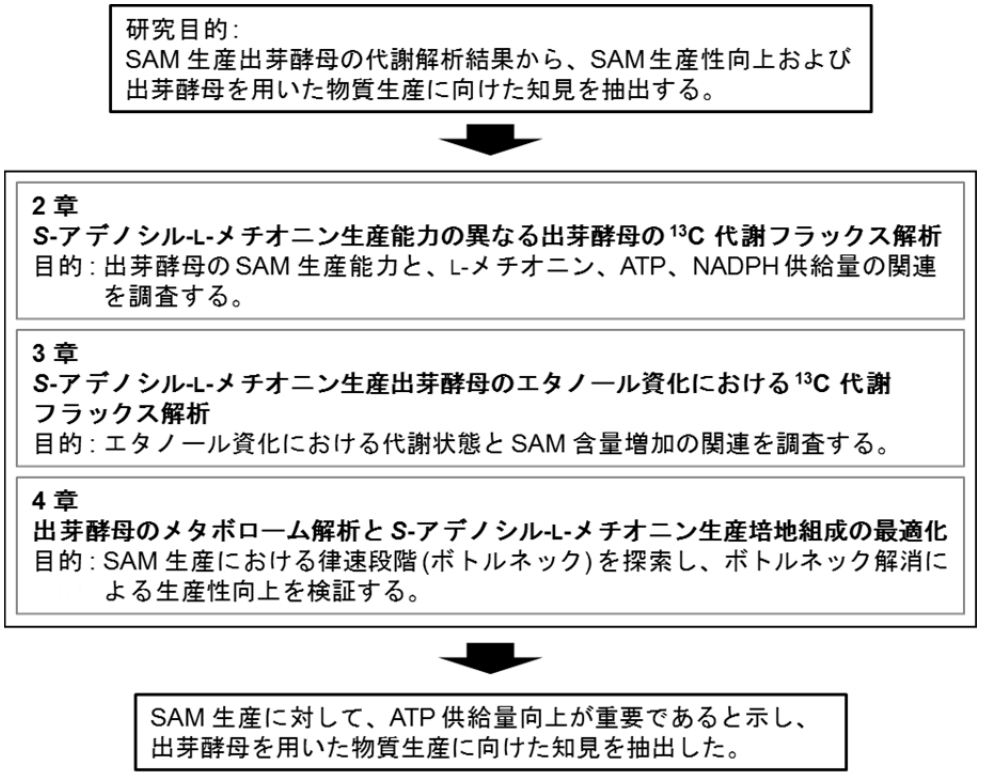


Fig. 1-5 本論文の構成

第 2 章　*S*-アデノシル-L-メチオニン生産能力の異なる出芽酵母の ^{13}C 代謝フラックス解析

2. 1. Highlights

- SAM 高生産株・清酒酵母協会 6 号の高生産能力に関連する代謝経路を明らかにする。

- 高生産株と実験室株における、SAM 生産に必要な因子を供給する中央代謝系の代謝反応速度を比較し、高生産株で活性化している代謝反応を特定するため、^{13}C-MFA を用いた。

- 高生産株では TCA 回路フラックスと酸化的リン酸化活性が高く、ATP 再生能が向上していた。

- 酸化的リン酸化では酸素が必要なため、SAM 生産性向上には、高 TCA 回路フラックスと高呼吸活性による ATP 供給量増加が重要と考えられた。

- 推定した代謝フラックス分布によって、高生産株の特徴である高呼吸活性を説明できたことから、実用酵母においても ^{13}C-MFA を適用できると考えられた。

- ^{13}C-MFA は高呼吸活性を指標とした新たな宿主のスクリーニング系としての活用が期待できる。

2. 2. 緒言

第 2 章では、実験室酵母と *S*-アデノシル-L-メチオニン (SAM) 高生産株・清酒酵母協会 6 号の細胞内代謝フラックス分布を比較し、清酒酵母の高生産能力に関与する代謝経路の探索を行った。清酒酵母の SAM 含量は 20 mg g CDW^{-1} に達し、実験室酵母の 4 倍程度になることが知られている (Shobayashi et al. 2006)。また、清酒酵母による SAM 高生産には、ATP から L-メチオニンへアデノシル基転移を触媒する methionine adenosyltransferase の高活性が関与していることが報告されている (Shiozaki et al. 1986)。一方で、細胞内代謝の改変によって SAM 生産性を向上させるために必要である SAM 高生産能力に関連する代謝経路は明らかとなっていない。

SAM は ATP と L-メチオニンが前駆体であり、これらは、中央代謝系のペントースリン酸経路と TCA 回路の中間代謝物であるリボース-5-リン酸とオキサロ酢酸から、それぞれ生合成される。また、SAM 生合成は、中央代謝系の反応過程から供給されるエネルギー分子 (ATP) や還元力 (NADPH) を必要とする (Fig. 1-3)。目的の代謝経路は中央代謝系と SAM 生合成経路の中に存在すると予想できるため、適切な方法によって探索することが求められる。そこで、^{13}C 代謝フラックス解析 (^{13}C-MFA) を用いて細胞内の中央代謝フラックス分布を推定し、中央代謝系から供給される SAM 前駆体、NADPH と ATP 量を見積もり、SAM 生産能力との関連を調査することにした。

SAM 高生産株では SAM 前駆体、ATP や NADPH 供給速度が高いことが予測される。そのため、清酒酵母と実験室酵母 (低生産株) における各代謝反応の反応速度を比較する必要がある。清酒酵母のほうが反応速度の高い代謝反応が SAM 高生産能力に関与すると推定される。複数の代謝反応速度を同時に定量的に把握する必要があり、その手段として ^{13}C-MFA が有効と考えられる。

細胞内の代謝反応速度は、個々の反応にかかわる基質、酵素、反応阻害剤や活性剤の細胞内濃度などから影響を受けるが、これらをすべて正確に定量することは非常に困難である。^{13}C-MFA を用いると、細胞乾燥重量あたりの代謝反応速度 (単位 : mmol g CDW^{-1} h^{-1}) で定義される代謝フラックスを数値として評価できることから、活性化あるいは活性低下している代謝反応の探索への活用が期待できる。代謝フラックスは直接測定できないため、^{13}C-MFA は ^{13}C で標識された炭素源を用いて培養した細胞内の代謝物の ^{13}C 標識状態を質量分析計で測定し、非線形の最適化計算方法を用いて標識状態を最もよく説明できる代謝フラックスを推定する (Toya and Shimizu 2013)。

本章では、出芽酵母の代謝モデルを構築し、グルコースを単一炭素源、制限基質とする連続培養条件における、実験室酵母 S288C と清酒酵母協会 6 号の中央代謝系の代謝フラックス分布を ^{13}C-MFA を用いて推定した。続いて、中央代謝系から供給される NADPH、ATP と SAM 前駆体量を見積もり、SAM 生産能力が異なる両株の結果を比較することで、生産能力に関与する代謝経路を探索した。

2. 3. 実験材料と実験方法

2. 3. 1. 使用菌株

本章では、出芽酵母である実験室酵母 S288C (NBRC1136)、清酒酵母協会 5 号 (NBRC2345)、同 6 号 (NBRC2346)、同 7 号 (NBRC2347)、同 8 号 (NBRC2376)、同 9 号 (NBRC2377) を用いた。全ての株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) から購入した。

2. 3. 2. SAM 生産能力の確認

SAM 生産能力を比較するため、各出芽酵母株を 4 mL の半合成培地 [50.0 g L^{-1} D-グルコース、10.0 g L^{-1} ペプトン (Polypepton、Nihon pharmaceutical)、5.0 g L^{-1} 酵母エキス (Bacto Yeast Extract、Difco Laboratories)、4.0 g L^{-1} KH_2PO_4、2.0 g L^{-1} K_2HPO_4、0.50 g L^{-1} $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$、1.5 g L^{-1} L-メチオニン、pH 6.0] (Shiozaki et al. 1984) に植菌し、30 °C、24 時間、200 rpm で振とう培養した。細胞内に蓄積した SAM を抽出するため、培養液に最終濃度と液量がそれぞれ 10% と 5 mL となるように 60% 過塩素酸を添加し、30 °C で 1 時間振とうした。遠心分離で上清を分取し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供した。HPLC は、LC2010A-HT (Shimadzu) を用いた。カラムは、TSKgel SP-2SW (4.6 mm × 25 cm、Tosoh)、ガードカラム用フィルターは SUMIPAX Filter PG-ODS (Sumika Chemical Analysis Service) を用い、波長 254 nm の吸収を測定することにより検出した。移動相には 0.5 M ギ酸アンモニウムを用い、流速は 0.5 mL min^{-1} とした。濃度標準液には SAM (A7007, Sigma-Aldrich) を純度 80%(w w^{-1}) として用いた。

2. 3. 3. ^{13}C-MFA 培養条件

^{13}C-MFA に必要な細胞試料を取得するため、250 mL 容培養槽 (ABLE) を用いて液量 100 mL、好気的条件で、炭素源を制限基質としたケモスタット連続培養を行った。1.0 *N* NaOH の添加により、培養液の pH を 5.5 となるように制御した。また、培養温度 30 °C、撹拌速度 1,000 rpm、通気流量 200 mL min^{-1} に設定した。培養には合成培地 [5.0 g L^{-1} D-グルコース、5.0 g L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$、0.50 g L^{-1} K_2HPO_4、3.4 g L^{-1} yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate (Difco Laboratories)、2.0 g L^{-1} KH_2PO_4、1.5 g L^{-1} $MgSO_4$、2.5 mg L^{-1} $ZnSO_4$、2.4 mg L^{-1} $MnSO_4$、0.27 mg L^{-1} $CuSO_4$、0.20 g L^{-1} $CaCl_2$、4.0 mg L^{-1} $FeCl_3$、0.40 mg L^{-1} $NaMoO_4\ 2H_2O$、1.0 mg L^{-1} H_3BO_3、0.20 mg L^{-1} KI、0.20 g L^{-1} NaCl、34 μg L^{-1} biotin、1.6 mg L^{-1} Ca-pantothenate、13 mg L^{-1} inositol、7.8 mg L^{-1} thiamine-HCl、2.3 mg L^{-1} pyridoxine-HCl、0.40 mg L^{-1} para-aminobenzoic acid、0.40 mg L^{-1} riboflavin、0.80 mg L^{-1} niacin、4.0 μg L^{-1} folic acid] を用いた。^{13}C-MFA のため、炭素源として用いたグルコースの一部を ^{13}C 標識グルコース (1-^{13}C グルコースと U-^{13}C グルコース) に置き換えた。グルコース分子の骨格を形成する炭素原子のうち 1 位の炭

素原子が ^{13}C で標識されているグルコースが 1-^{13}C グルコース、1 位から 6 位の炭素原子すべてが ^{13}C で標識されているグルコースが U-^{13}C グルコースである。

各培養実験 (清酒酵母協会 6 号 : 希釈率 0.1 h^{-1} と 0.06 h^{-1}、実験室酵母 S288C : 希釈率 0.1 h^{-1} と 0.06 h^{-1}) における各グルコース割合 (天然/1-^{13}C/U-^{13}C) は、それぞれ、60.3/20.2/19.5、60.4/20.2/19.5、60.2/20.2/19.6、60.3/20.2/19.6 とした。培養槽から取得した培養液は、遠心分離 (18,800 × *g*、4 °C、5 分) で上清と細胞を分離した。上清は細胞外に排出された代謝物の定量分析に用いた。細胞はガスクロマトグラフィー-質量分析計 (GC-MS) による ^{13}C 濃縮度分析に用いた。

2. 3. 4. オフライン測定

細胞濃度は波長 600 nm の吸光度 (OD_{600}) を測定することにより求めた。OD_{600} から細胞乾燥重量 (CDW) への換算係数は、1 OD_{600} あたり 0.21 g CDW L^{-1} (清酒酵母協会 6 号) と 0.22 g CDW L^{-1} (実験室酵母 S288C) とした。グルコースとエタノール濃度はバイオセンサ (BF-7、Oji Scientific Instruments) を用いて酵素電極法によって測定した。グリセロール濃度は F-kit Glycerol (R-Biopharm) によって測定した。有機酸 (ピルビン酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、クエン酸、乳酸) 濃度は HPLC を用いて測定した。HPLC は LC2010A-HT を用いた。カラムは TSKgel OA-pakA (7.8 mm × 30 cm、Tosoh)、ガードカラムは TSKgel OA-pakP (6.0 mm × 4.0 cm、Tosoh) を用い、波長 210 nm の吸収を測定することにより検出した。移動相には 0.75 mM H_2SO_4 を用い、流速は 0.8 mL min^{-1} とした。

2. 3. 5. タンパク質由来アミノ酸 GC-MS 分析

回収した細胞は 105 °C で 18 時間、6 *N* HCl で加水分解した。フィルターろ過により浮遊物を除去した後、加水分解物を乾燥させ、アセトニトリルに溶解した。GC-MS に供するため、加水分解物と等量の *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyl-trifluoroacetamide (MTBSTFA) を混合し、105 °C で 1 時間反応させた。アミノ酸は MTBSTFA による TBDMS (*tert*-butyldimethylsililyl) 化反応により、Fig. 2-1 で示したように修飾される。続いて、試料 1 μL を GC-MS システム (7890A GC、5975C GC/MSD、Agilent Technologies) に注入し、各アミノ酸の ^{13}C 濃縮度を測定した。GC-MS 分析は、カラムには Capillary column (DB-5MS + DG、30m × 0.25 mm ID × 0.25 μm、Agilent Technologies) を用いた。キャリアーガスはヘリウムを用い、流速は 1.0 mL min^{-1} とした。オーブン温度は、始めに 150 °C で 2 min 保ち、その後 270 °C になるまで 3 °C min^{-1} 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、スプリット比は 1:10、電子イオン化は 70 eV と設定し、Selected ion monitoring モードで分析した (Mori et al. 2011; Toya et al. 2014)。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. 2-2 のようにフラグメント化が起きる (Mawhinney et al. 1986)。GC-MS 測定結果は、C、

H、N、O、Si 各原子の天然存在同位体の影響を考慮して補正し、^{13}C-MFA に用いた (van Winden et al. 2002)。

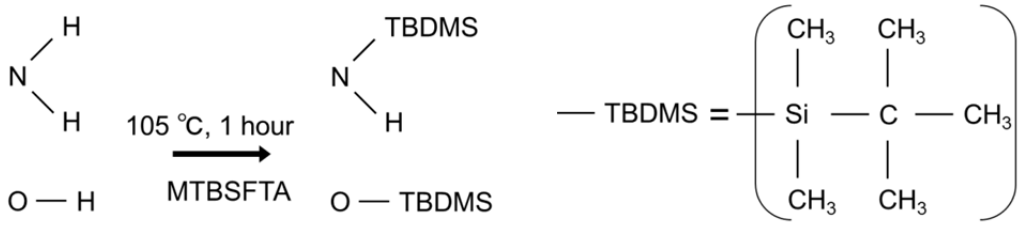


Fig. 2-1 TBDMS 化反応

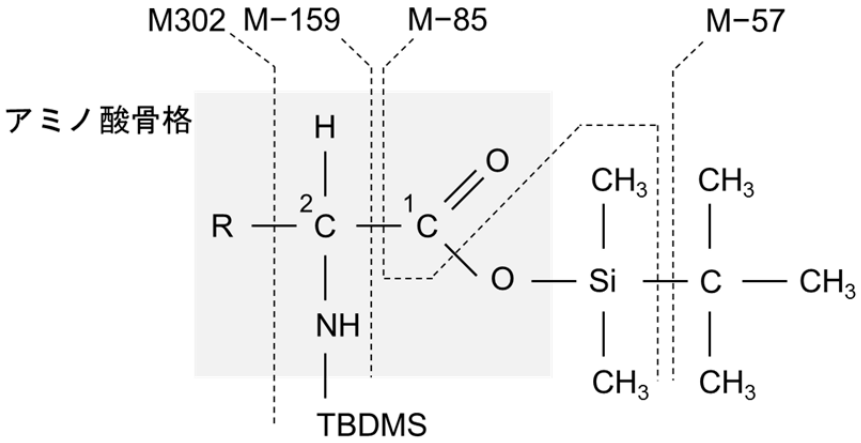


Fig. 2-2 測定されるアミノ酸フラグメントイオンのパターン
一部の炭素原子の左肩にある数字は、アミノ酸における炭素の位置番号を表す。M−57 フラグメント：全ての炭素骨格の情報を持つ、M−85 フラグメント：1 位の炭素の情報が失われている、M−159 フラグメント：1 位の炭素の情報が失われている、M302 フラグメント：1 と 2 位の炭素の情報を持ち、全アミノ酸で共通である。

2. 3. 6. 代謝ネットワークモデル

出芽酵母の代謝ネットワークは先行文献を適宜修整したものを用いた (Table 2-1、Table S1) (Frick and Wittmann 2005; Gombert et al. 2001)。本章の代謝モデルでは、オキサロ酢酸、ピルビン酸、アセチル-CoA は細胞質とミトコンドリアに区分した。補充経路であるピルビン酸のカルボキシル化反応は細胞質で進行するとした (Walker et al. 1991)。malic enzyme 反応はミトコンドリアで進行するとした (Boles et al. 1998)。ピルビン酸とアセチル-CoA の膜輸送は細胞質からミトコンドリアへの不可逆反応、オキサロ酢酸の膜輸送は可逆反応とした (Frick and Wittmann 2005; Gombert et al. 2001)。さらに、各アミ

ノ酸の生合成経路を加えた (Table S1) (Monschau et al. 1997)。出芽酵母細胞を構成するタンパク質、脂質、DNA、RNA、炭水化物の含量と組成は文献値を用いた (Table S2–5) (Förster et al. 2003; Stückrath et al. 2002)。これらのデータと同化代謝の反応式を用いて、細胞増殖に必要な前駆体量を推算し (Table 2-2)、^{13}C-MFA の束縛条件とした (Table 2-5)。

Table 2-1 ^{13}C-MFA で使用した出芽酵母の代謝モデル

Flux_number	Reaction	Carbon atom transitions
r1	Glc --> G6P	ABCDEF --> ABCDEF
r2	G6P --> 6PG	ABCDEF --> ABCDEF
r3	6PG --> Ru5P + CO_2_in	ABCDEF --> BCDEF + A
r4	G6P --> F6P	ABCDEF --> ABCDEF
r5	F6P --> G6P	ABCDEF --> ABCDEF
r6	F6P --> DHAP + GAP	ABCDEF --> CBA + DEF
r7	DHAP + GAP --> F6P	CBA + DEF --> ABCDEF
r8	DHAP --> GAP	ABC --> ABC
r9	GAP --> DHAP	ABC --> ABC
r10	GAP --> PGA	ABC --> ABC
r11	PGA --> GAP	ABC --> ABC
r12	PGA --> PEP	ABC --> ABC
r13	PEP --> PGA	ABC --> ABC
r14	PEP --> Pyr_cyt	ABC --> ABC
r15	Pyr_cyt --> Pyr_mit	ABC --> ABC
r16	Pyr_mit --> AcCOA_mit + CO_2_in	ABC --> BC + A
r17	Oxa_mit + AcCOA_mit --> IsoCit	ABCD + EF --> DCBFEA
r18	IsoCit --> aKG + CO_2_in	ABCDEF --> ABCDE + F
r19	aKG --> Suc + CO_2_in	ABCDE --> BCDE + A
r20	Suc --> Mal	ABCD --> ABCD
r21	Mal --> Suc	ABCD --> ABCD
r22	Mal --> Oxa_mit	ABCD --> ABCD
r23	Oxa_mit --> Mal	ABCD --> ABCD
r24	Mal --> Pyr_mit + CO_2_in	ABCD --> ABC + D
r25	Pyr_cyt --> AcAl + CO_2_in	ABC --> BC + A
r26	AcAl --> Ac	AB --> AB
r27	Ac --> AcCOA_cyt	AB --> AB
r28	AcCOA_cyt --> AcCOA_mit	AB --> AB
r29	Oxa_mit --> Oxa_cyt	ABCD --> ABCD
r30	Oxa_cyt --> Oxa_mit	ABCD --> ABCD
r31	Pyr_cyt + CO_2_in --> Oxa_cyt	ABC + D --> ABCD
r32	Oxa_cyt --> Thr	ABCD --> ABCD
r33	Thr --> Gly + AcAl	ABCD --> AB + CD
r34	Ru5P --> R5P	ABCDE --> ABCDE

Table 2-1 ^{13}C-MFA で使用した出芽酵母の代謝モデル (続き)

Flux_number	Reaction	Carbon atom transitions
r35	R5P --> Ru5P	ABCDE --> ABCDE
r36	Ru5P --> Xu5P	ABCDE --> ABCDE
r37	Xu5P --> Ru5P	ABCDE --> ABCDE
r38	R5P + Xu5P --> S7P + GAP	ABCDE + FGHIJ --> FGABCDE + HIJ
r39	GAP + S7P --> R5P + Xu5P	HIJ + FGABCDE --> FGHIJ + ABCDE
r40	GAP + S7P --> F6P + E4P	ABC + DEFGHIJ --> DEFABC + GHIJ
r41	E4P + F6P --> S7P + GAP	GHIJ + DEFABC --> DEFGHIJ + ABC
r42	E4P + Xu5P --> F6P + GAP	ABCD + EFGHI --> EFABCD + GHI
r43	GAP + F6P --> Xu5P + E4P	GHI + EFABCD --> EFGHI + ABCD
r44	PGA --> Ser	ABC --> ABC
r45	Ser --> Gly + CO_2_in	ABC --> AB + C
r46	IsoCit --> Suc + Glxy	ABCDEF --> EDCF + AB
r47	Glxy + AcCOA_cyt --> Oxa_cyt	AB + CD --> ABDC
r48	Pyr_cyt --> pre_Ala	ABC --> ABC
r49	Pyr_mit --> pre_Ala	ABC --> ABC
r50	AcAl --> EtOH_ex	
r51	G6P --> [Biomass]	
r52	AcCOA_cyt --> [Biomass]	
r53	Gly --> [Biomass]	
r54	Ser --> [Biomass]	
r55	Oxa_cyt --> [Biomass]	
r56	R5P --> [Biomass]	
r57	E4P --> [Biomass]	
r58	GAP --> [Biomass]	
r59	PGA --> [Biomass]	
r60	PEP --> [Biomass]	
r61	pre_Ala --> [Biomass]	
r62	Pyr_mit --> [Biomass]	
r63	AcCOA_mit --> [Biomass]	
r64	aKG --> [Biomass]	
r65	Thr --> [Biomass]	
r66	Oxa_cyt --> SAM	
r67	Mal --> Mal_ex	
r68	Ac --> Ac_ex	
r69	Pyr_cyt --> Lac_ex	
r70	Pyr_cyt --> Pyr_cyt	
r71	IsoCit --> Cit_ex	
r72	Suc --> Suc_ex	
r73	DHAP --> Glyc_ex	
r74	CO_2 --> CO_2_in	A --> A
r75	CO_2_in --> CO_2_ex	A --> A

CO_2_ex, 細胞外 CO_2; CO_2_in, 細胞内 CO_2; pre_Ala, Ala 前駆体; [Biomass], 細胞構成成分

Table 2-2 細胞合成に必要な前駆体量 (μmol g CDW^{-1})

使用炭素源	グルコース
Glucose 6-phosphate	2306
Ribose 5-phosphate	297
Erythrose 4-phosphate	206
Glyceraldehyde 3-phosphate	80
Phosphoglycerate/Glyoxylate (for glycine)	0
Phosphoglycerate/Oxaloacetate (for glycine)	288
Phosphoglycerate (for others)	277
Phosphoenolpyruvate	391
Oxaloacetate (for threonine)	180
Oxaloacetate (for others)	641
Pyruvate (for alanine)	316
Pyruvate (mitochondrial, for others)	867
Acetyl-CoA (cytosolic)	2242
Acetyl-CoA (mitochondrial)	259
α-ketoglutarate	975

2. 3. 7. ^{13}C 代謝フラックス解析

代謝フラックスを導出するフィッティング計算は、ソフトウェア MATLAB (MathWorks) を用いた専用プログラム OpenMebius (Kajihata et al. 2014) により行った。タンパク質由来アミノ酸 ^{13}C 濃縮度の実験データとランダムに与えた代謝フラックス分布から計算的に予測されたデータを比較し、残差二乗和が最小となるまで、20 個の独立フラックスの数値を変えて繰り返し計算を行った。さらに、CO_2 の ^{13}C 標識パターンはフラックス導出計算過程で独立的に最適値を求めた。非線形最適化計算には MATLAB optimization toolbox の “fmincon” function (MathWorks) を用いた。フラックス導出計算には以下のアミノ酸フラグメントを用いた。M−57 フラグメント : Ala、Asp、Glu、Gly、Phe、Thr、M−85 フラグメント : Ala、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Pro、Thr、Val、M−159 フラグメント : Glu、Ile、Leu、Pro、Val、M302 フラグメント : Asp。異なるグルコース比消費速度の代謝フラックス分布を比較するために、グルコース比消費速度を 100 として、算出した全てのフラックスを規格化した。

各代謝フラックスの 90% 信頼区間は *F* 分布を用いたグリッドサーチ法によって求めた (Antoniewicz et al. 2006; van Winden et al. 2005)。1 反応ずつ代謝フラックスをある値に固定し、残りの代謝フラックスについてフィッティング計算を行うことで残差二乗和を算出した。残差二乗和が (1) 式で示した *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 90% 信頼区間とした (Fig. 2-3)。

$$\mathrm{SSR}(\mathbf{r})|_{\mathrm{x=x0}} \leq \mathrm{SSR}(\hat{\mathbf{r}}) \cdot \left(1 + \frac{F(1, n-p)}{n-p}\right) \qquad (1)$$

r は代謝フラックス分布、SSR(**r**) は代謝フラックス分布 **r** が与える残差二乗和、x は着目している代謝反応のフラックス値、x0 は x 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 = 82 (^{13}C 濃縮度データの自由度) からパラメータ数 p = 21 (推定する代謝フラックス数) を引いた、自由度 61 の *F* 分布に基づいて信頼区間を求めた。

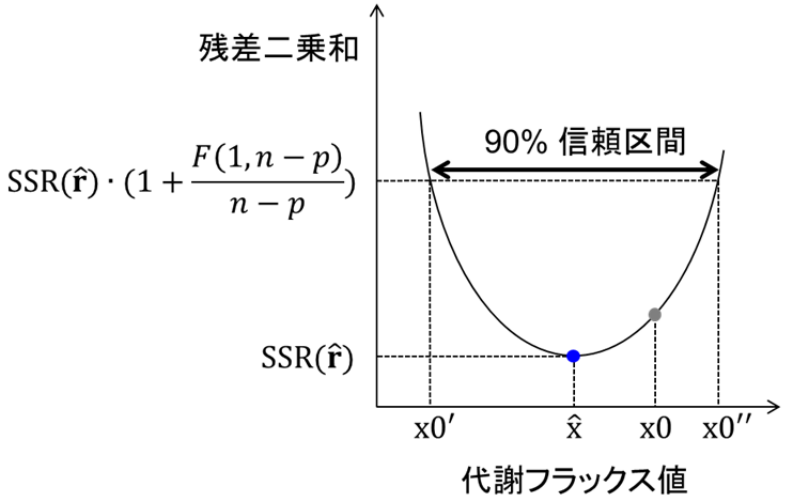


Fig. 2-3 90% 信頼区間の算出方法
90% 信頼区間は x0′ から x0″ までの範囲となる。

2. 3. 8. 細胞増殖と SAM 生合成に必要な NADPH と ATP 量の算出

細胞増殖に必要な NADPH と ATP 量は文献値を用いた (NADPH: 10.01 mmol g CDW^{-1}、ATP: 39.78 mmol g CDW^{-1}) (Frick and Wittmann 2005; Verduyn 1991)。増殖非連動性 ATP 要求量は 1.0 mmol g CDW^{-1} h^{-1} とした (Verduyn et al. 1990)。SAM 生合成に必要な NADPH と ATP 量は、KEGG データベース (http://www.genome.jp/kegg/) の SAM 生合成経路から算出した (Table 2-3、2-4)。SAM 1 mol あたり NADPH は 11 mol (オキサロ酢酸を前駆体とした L-メチオニン合成に 7.5 mol、リボース-5 リン酸を前駆体とした ATP 合成に 3.5 mol 必要である)、ATP は 13 mol (オキサロ酢酸を前駆体とした L-メチオニン合成に 3 mol、リボース-5 リン酸を前駆体とした ATP 合成に 10

mol 必要である) 必要となる結果を得た。なお、0.5 mol のグリシンの分解により、1 mol のメチル基を転移できると仮定した。

Table 2-3 SAM 生合成における NADPH 消費反応

反応式
L-メチオニン合成
4pasp + H + NADPH --> aspsa +NADP + pi
akg + H + NADPH + NH4 --> glu-L + H2O + NADP
(2) H + mlthf + NADPH --> 5mthf + NADP
(5) H + (3) NADPH + SO3 <==> (3) H2O + H2S + (3) NADP
H + NADPH + trdox --> NADP + trdrd
ATP 合成
akg + H + NADPH + NH4 --> glu-L + H2O + NADP

代謝物名: 4pasp, 4-Phospho-L-aspartate; 5mthf,5-Methyltetrahydrofolate; aspsa, L-Aspartate 4-semialdehyde; akg, 2-Oxoglutarate; glu-L, L-Glutamate; mlthf, 5,10-Methylenetetrahydrofolate; pi, Phosphate; trdox, Oxidized thioredoxin; trdrd, Reduced thioredoxin

Table 2-4 SAM 生合成における ATP 消費反応

反応式
L-メチオニン合成
aps + ATP --> ADP + H + paps
asp-L + ATP --> 4pasp + ADP
H2O + pap --> AMP + pi
ATP 合成
ATP + glu-L + NH4 --> ADP + gln-L + H + pi
ATP + Gly + pram <==> ADP + gar + H + pi
ATP + fpram --> ADP + air + (2) H + pi
5aizc + asp-L + ATP <==> 25aics + ADP + H + pi
ATP + fgam + gln-L + H2O --> ADP + fpram + glu-L + H + pi
ATP + R5P <==> AMP + H + prpp
asp-L + GTP + IMP --> dcamp + GDP + (2) H + pi
AMP + GTP <==> ADP + GDP

代謝物名: 25aics, *S*-2-[5-Amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole-4-carboxamido]succinate;
5aizc, 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole-4-carboxylate;
air, 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole; aps, Adenosine 5'-phosphosulfate;
asp-L, L-Aspartate; dcamp, N6-(1,2-Dicarboxyethyl)-AMP;
fgam, N2-Formyl-N1-(5-phospho-D-ribosyl)glycinamide;
fpram, 2-(Formamido)-N1-(5-phospho-D-ribosyl)acetamidine;
gar, N1-(5-Phospho-D-ribosyl)glycinamide; gln-L, L-Glutamine;
pap, Adenosine 3',5'-bisphosphate; paps, 3'-Phosphoadenylyl sulfate;
pram, 5-Phospho-beta-D-ribosylamine; prpp, 5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate

2. 4. 実験結果

2. 4. 1. 各出芽酵母株の SAM 生産能力の確認

SAM 生産能力を比較するため、実験室酵母 S288C と 5 種類の清酒酵母 (協会 5 号、6 号、7 号、8 号、9 号) を、SAM 前駆体である L-メチオニンを添加した半合成培地で培養した。清酒酵母の SAM 生産能力は実験室酵母 S288C (56 mg L^{-1}) の 3–4 倍に達していた (Fig. 2-4)。本章で用いた株の中では、清酒酵母協会 6 号の SAM 生産能力が最も高く、202 mg L^{-1} に達した。そこで本章では、SAM 生産能力にかかわる中央代謝の変化を調査するため、SAM 高生産株 (清酒酵母協会 6 号) と対照株 (実験室酵母 S288C) の代謝状態を比較することにした。

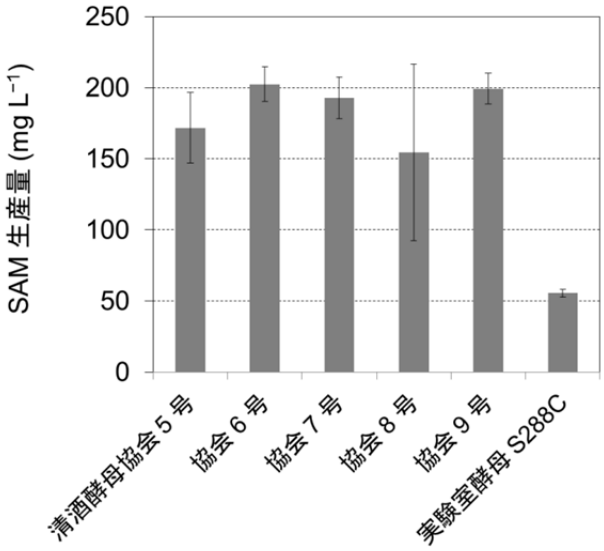


Fig. 2-4 各出芽酵母株の SAM 生産能力
棒グラフは 3 回の培養実験の平均値を、エラーバーは平均値に対する標準偏差を、それぞれ表している。

2. 4. 2. ^{13}C-代謝フラックス解析 (^{13}C-MFA)

^{13}C-MFA に必要な細胞試料を取得するため、好気条件でグルコースを制限基質として、2 通りの希釈率 (0.1 h^{-1}、0.06 h^{-1}) のケモスタット連続培養を行った。全ての培養実験結果を Table 2-4 に示した。どちらの希釈率においても、清酒酵母協会 6 号の SAM 生産性 (1.5–2.5 mg L^{-1}) は、実験室酵母 S288C 株 (0.60–0.87 mg L^{-1}) の 2.5–2.9

倍大きい値となった。また、細胞濃度は清酒酵母協会 6 号のほうが低い結果となった。

希釈率 0.1 h^{-1} 条件では、両株ともほぼ同程度のグルコース比消費速度を示した (1.1 mmol g CDW^{-1} h^{-1})。一方で、清酒酵母協会 6 号は、酢酸とグリセロール収率が低く、エタノール生産収率が高くなる結果となった。前者は、清酒酵母の好気的条件における Acetyl-CoA synthetase (*ACS1*) の発現と細胞質 NADH 酸化活性の向上と関連し (Shobayashi et al. 2007b; Agrimi et al. 2014)、後者は、清酒酵母は実験室酵母より高いエタノール生産性を示す特性 (Kotaka et al. 2008) と関連していると考えられた。希釈率 0.06 h^{-1} 条件では、実験室酵母 S288C がエタノールを 13 mol / 100 mol $glucose^{-1}$ の収率で生産したが、清酒酵母協会 6 号はエタノールを生産しなかった。この結果から、清酒酵母協会 6 号を含む二倍体酵母は、低希釈率・好気条件では、Crabtree 効果が抑制される可能性が考えられた (Akada 2002)。希釈率 (比増殖速度) と細胞の炭素含量、グルコース比消費速度、SAM 等の生産物比生産速度から CO_2 収率を見積もると、どちらの希釈率条件においても清酒酵母協会 6 号の方が高い値となった。また、培養実験で取得した各生産物の比生産速度データを用いて生産物合成フラックスを計算し、^{13}C-MFA の束縛条件とした (Table 2-6)。

細胞増殖の定常を確認した後、^{13}C 標識グルコースを含む培地の流加を開始し、連続培養を行った。清酒酵母協会 6 号を用いた希釈率 0.1 h^{-1} 条件では、培養開始 49 時間後に培地を変更した。細胞試料は、^{13}C 標識グルコース流加後、0、2.5、3.3、5 レジデンスタイム経過後に回収した。なお、1 レジデンスタイムとは、培養槽の培地が、培地の流入により 1 回置き換わるまでに要する時間である。回収した細胞を酸加水分解し、フィルターろ過により浮遊物を除去後、タンパク質由来アミノ酸を構成する炭素の ^{13}C 濃縮度を GC-MS 分析によって測定した (Fig. 2-5、Fig. S1)。Fig. 2-5 に、Glx (Glu と Gln) と Phe の M−57 フラグメントの ^{13}C 標識パターンについて、各質量同位体の存在比の経時変化を示した。^{13}C を含まない質量同位体の存在比 (m0) は時間依存で減少しているのに対し、^{13}C を含む質量同位体の存在比 (m1–m9) は増加していた。なお、^{13}C を *n* 個含む質量同位体の存在比を m*n* とした。3.3 レジデンスタイム以降は、^{13}C 標識パターンに変化が見られなかったため、細胞内代謝は、^{13}C 標識レベルで定常に達していると考えられた。本章では、5 レジデンスタイム経過後の ^{13}C 濃縮度データを用いて、代謝フラックス分布を導出した。

本章の代謝ネットワークは先行文献で用いられた代謝モデルを適宜修整したものを用いた (Table 2-1、Table S1) (Frick and Wittmann 2005; Gombert et al. 2001)。本章のモデルでは、ピルビン酸、オキサロ酢酸、アセチル-CoA を細胞質とミトコンドリアに分画した。細胞内代謝フラックス分布は、GC-MS 測定を用いて実験的に得られたタンパク質由来アミノ酸の ^{13}C 濃縮度と計算機上で代謝モデルを用いて求めた ^{13}C 濃縮度 の差を最小化することによって推定した。実験的 ^{13}C 濃縮度と推定した代謝フラックス分布から求めた ^{13}C 濃縮度の差はとても小さく、推定した代謝フラックス分布は、実

Table 2-4 好気的グルコース制限ケモスタット連続培養実験結果

株	実験室酵母 S288C		清酒酵母 協会 6 号	
希釈率 (h^{-1})	0.06	0.1	0.06	0.1
SAM 生産量 (mg L^{-1})	0.60	0.87	1.5	2.5
細胞乾燥重量濃度 (g CDW L^{-1})	2.8	2.7	2.5	2.5
グルコース比消費速度 (mmol g CDW^{-1} h^{-1})	0.55	1.1	0.65	1.1
対グルコース収率 (mol 100 mol^{-1})				
SAM	0.0055	0.0081	0.014	0.024
リンゴ酸	0.48	0.57	0.55	0.39
酢酸	2.3	2.1	0.76	0
乳酸	0.31	0	0.91	0
クエン酸	0.095	0	0.21	0
コハク酸	0.25	0	0.65	0
グリセロール	0.23	0.26	0.053	0.17
エタノール	13	13	0	14
CO_2 (mol C mol C^{-1})[a]	0.24	0.33	0.41	0.36

1 回の培養実験で全データを得た。

[a] 希釈率 (比増殖速度) と細胞の炭素含量 (0.455 g g CDW^{-1}) (Stückrath et al. 2002)、グルコース比消費速度、SAM 等生産物の比生産速度から算出した炭素収率から見積もった。炭素収率の合計は 1 とした。

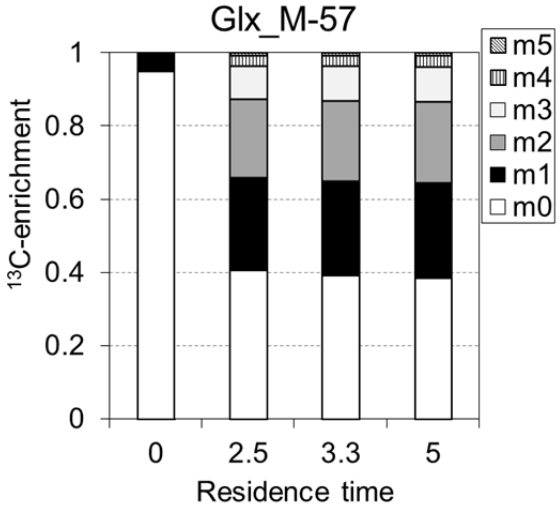
験的 ^{13}C 濃縮度データをよく説明できていると考えられた。なお、残差の二乗和は 0.0018 以下であった (Table S7–10)。最小の残差となる代謝フラックス分布をもとに、グリッドサーチ法を用いて、各代謝フラックスの 90% 信頼区間を求めた。

異なる連続培養条件 (希釈率 0.06 h^{-1} と 0.1 h^{-1}) における実験室酵母 S288C と清酒酵母協会 6 号の代謝フラックスの 90% 信頼区間を Fig 2-6 に示した。当結果は、グルコースを制限基質とした希釈率 0.1–0.15 h^{-1} のケモスタット培養で代謝フラックス解析を行った先行文献と合致していた (Frick and Wittmann 2005; Gombert et al. 2001; Wang and Hatzimanikatis 2006)。TCA 回路フラックスは循環しており、malic enzyme により触媒される反応 (Mal --> Pyr_mit + CO_2) のフラックスと pyruvate carboxylase により触媒される反応 (Pyr_cyt + CO_2 --> Oxa_cyt) のフラックスは、それぞれ 2–12、18–28 であった。さらに、ペントースリン酸経路フラックス (G6P --> Ru5P + CO_2) は、glucose-6-phosphate isomerase により触媒される反応 (G6P --> F6P) のフラックスより高い値となった。この結果は、ペントースリン酸経路へ向かうフラックス (44–58、希釈率 0.06 h^{-1}、実験室酵母 S288C) は、解糖系に向かうフラックスより高いことを示している。希釈率 0.1 h^{-1} では、ペントースリン酸経路フラックスが 56–71 まで増加していたことから、実験室酵母 S288C において、細胞構成成分の合成に要する NADPH を供給するため、ペントースリン酸経路フラックスと比増殖速度 (希釈率) の関連が示唆された。一方で、清酒酵母協会 6 号では、希釈率 0.06 h^{-1} (56–89) を 0.1 h^{-1} (45–62) と比較すると、ペントースリン酸経路のフラックスが減少していた。

また、両株の TCA 回路の代謝フラックスは大きく異なっていた。例えば、希釈率 0.1 h^{-1} では、malate dehydrogenase フラックス (Mal <-> Oxa_mit) の 90% 信頼区間は、実験室酵母 S288C では 22–32、清酒酵母協会 6 号では 35–44 となった。希釈率 0.06 h^{-1} では、同反応の 90% 信頼区間は、実験室酵母 S288C が 20–30、清酒酵母協会 6 号が 35–48 であった。フラックスの信頼区間が重なっていない場合、フラックスレベルが著しく異なることを示している。TCA 回路中の他の代謝反応のフラックスにおいても同様に両株の 90% 信頼区間は重ならない結果が得られた。

C2 同化代謝であるグリオキシル酸経路フラックスは 0.4–6% であったことから、^{13}C-MFA によって同経路が不活性であることが示された。この結果は、グルコース存在下での isocitrate lyase と malate synthase 発現量抑制によるものと考えられた (de Jong-Gubbels et al. 1995)。

(a)



(b)

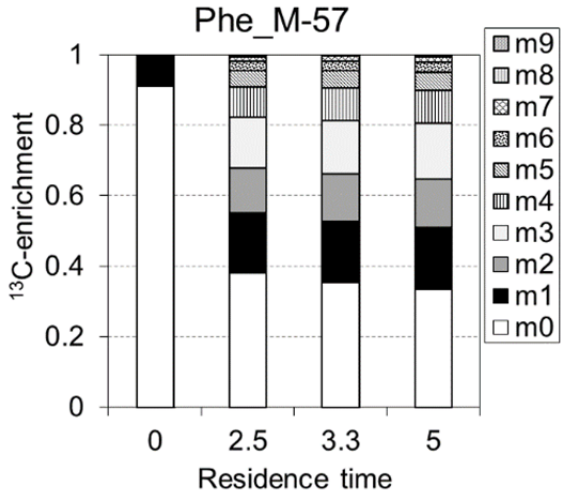


Fig. 2-5 希釈率 0.1 h^{-1} における清酒酵母協会 6 号のタンパク質構成アミノ酸 ^{13}C 濃縮度 (^{13}C-enrichment) 経時変化

(a) Glx と (b) Phe の M−57 フラグメントを示した。Residence time (レジデンスタイム) は、^{13}C 標識グルコースの流加を開始した時点を 0 とした。m*n* は、*n* 個の ^{13}C 原子を含む質量同位体を表す。その他のアミノ酸は Fig. S1 に示した。

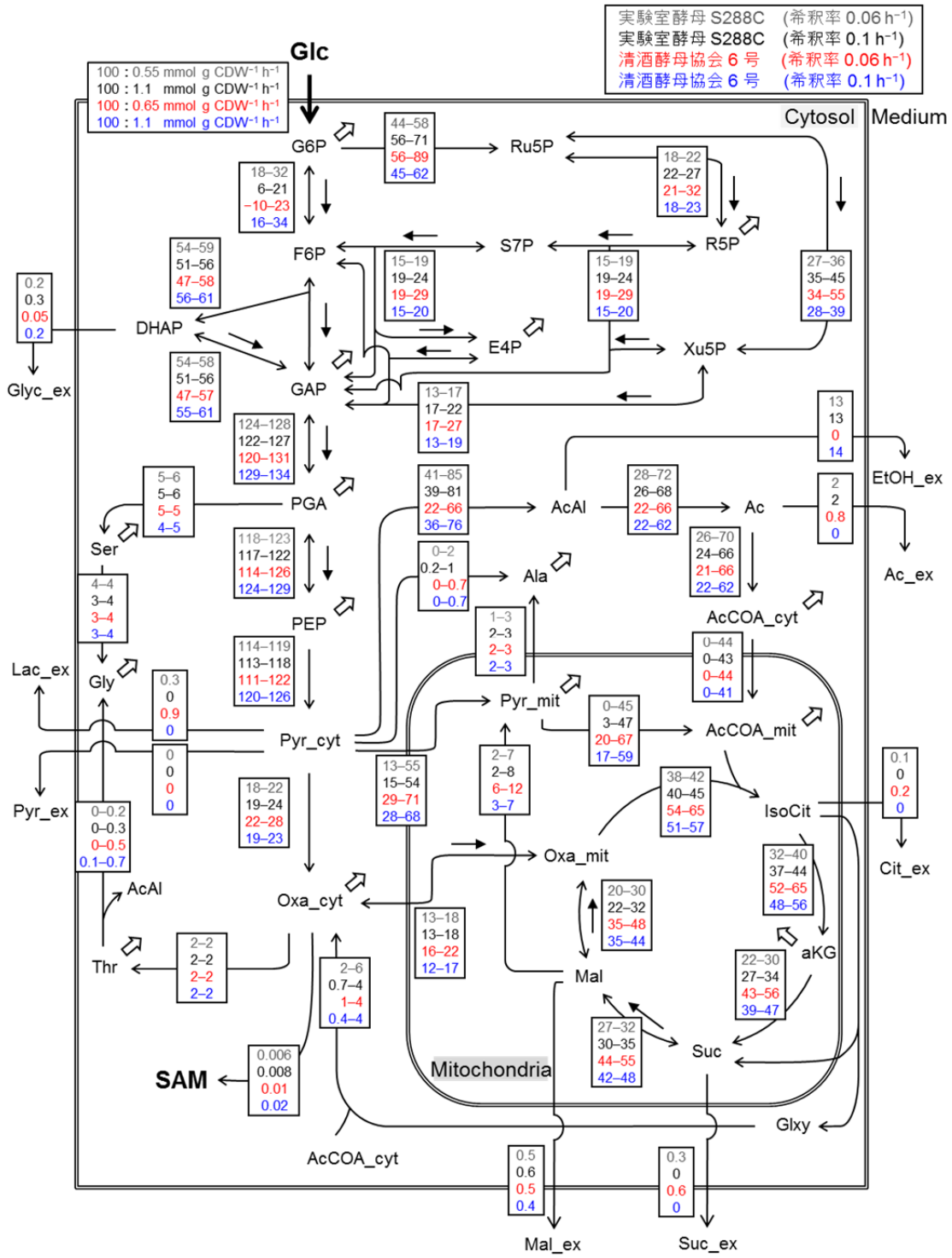


Fig. 2-6 実験室酵母 S288C と清酒酵母協会 6 号の代謝フラックス分布

すべての代謝フラックス値は 90% 信頼区間で示した。グルコース消費速度を 100 として規格化した値とした。可逆反応は矢印でフラックスの向きを示した。代謝中間体から細胞構成成分へ向かう同化代謝反応はブロック矢印で表し、フラックス値は Table 2-5 で示した。

Table 2-5 グルコース資化培養の細胞構成成分合成フラックス

株	実験室酵母 S288C		清酒酵母 協会 6 号	
希釈率 (h^{-1})	0.06	0.1	0.06	0.1
反応式				
G6P --> [Biomass]	23.9	22.7	21.4	21.4
AcCOA_cyt --> [Biomass]	23.2	22.1	20.8	20.8
Gly --> [Biomass]	4.0	3.8	3.6	3.6
Ser --> [Biomass]	1.8	1.7	1.6	1.6
Oxa_cyt --> [Biomass]	6.7	6.4	6.0	6.0
R5P --> [Biomass]	3.1	2.9	2.7	2.7
E4P --> [Biomass]	2.1	2.0	1.9	1.9
GAP --> [Biomass]	0.8	0.8	0.7	0.7
PGA --> [Biomass]	0.05	0.04	0.04	0.04
PEP --> [Biomass]	4.0	3.9	3.6	3.6
pre_Ala --> [Biomass]	3.3	3.1	2.9	2.9
Pyr_mit --> [Biomass]	12.2	11.7	11.0	11.0
AcCOA_mit --> [Biomass]	2.7	2.6	2.4	2.4
aKG --> [Biomass]	10.1	9.6	9.0	9.0
Thr --> [Biomass]	1.9	1.8	1.7	1.7

各前駆体から細胞構成成分へのフラックス値は Table 2-2 で示した値と下記式から求めた。

$$細胞構成成分合成フラックス = \frac{W}{v \times 1000} \times D \times 100$$

v はグルコース比消費速度 (mmol g CDW^{-1} h^{-1})、D は希釈率 (h^{-1})、W は Table 2-2 で示した細胞構成成分の合成に必要な前駆体量 (μmol metabolite g CDW^{-1}) を表している。すべてのフラックスは、グルコース比消費速度を 100 として規格化した。

Table 2-6 グルコース資化培養の生産物合成フラックス

株	実験室酵母 S288C		清酒酵母 協会 6 号	
希釈率 (h^{-1})	0.06	0.1	0.06	0.1
反応式				
AcAl --> EtOH_ex	12.9	12.8	0.0	14.4
Oxa_cyt --> SAM	0.006	0.008	0.01	0.02
Mal --> Mal_ex	0.5	0.6	0.5	0.4
Ac --> Ac_ex	2.3	2.1	0.8	0.0
Pyr_cyt --> Lac_ex	0.3	0.0	0.9	0.0
Pyr_cyt --> Pyr_cyt	0.0	0.0	0.0	0.0
IsoCit --> Cit_ex	0.1	0.0	0.2	0.0
Suc --> Suc_ex	0.3	0.0	0.6	0.0
DHAP --> Glyc_ex	0.2	0.3	0.05	0.2

各前駆体から生産物 (SAM、エタノール、グリセロール、乳酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、ピルビン酸、コハク酸) へのフラックス値は培養実験結果と下記式から求めた。

$$\text{生産物合成フラックス} = \frac{\rho}{\nu \times 1000} \times 100$$

ρ は各生産物の比生産速度 (μmol g CDW^{-1} h^{-1}) を表す。すべてのフラックスは、グルコース比消費速度を 100 として規格化した。

2. 4. 3. 酸化還元バランス

^{13}C-MFA によって、細胞質オキサロ酢酸から SAM 生合成へ流れるフラックスは、グルコース消費フラックスの 0.006–0.02% であることを示した (Fig. 2-6)。細胞質オキサロ酢酸が関与する代謝フラックスレベルは、どちらの株においてもほぼ同様な値を示していたことから、オキサロ酢酸の消費は代謝フラックス分布に影響していないと考えられた。そこで、補因子 (NADPH、ATP) 収支と SAM 生合成の関連を調査することにした。

NADPH バランスを調べるために、代謝フラックス分布から NADPH 供給フラックスを導出し、細胞増殖で使用する消費フラックスと比較した。出芽酵母では、SAM 生合成に必要な NADPH は、ペントースリン酸経路 (glucose-6-phosphate dehydrogenase と phosphogluconate dehydrogenase が触媒する反応)、malic enzyme と isocitrate dehydrogenase で触媒される反応から供給される (Table 2-7)。細胞増殖に必要な NADPH 消費フラックスは、先行文献データを用いて求めた。Fig. 2-7a で示したように、全ての培養条件で、NADPH 供給フラックスは消費フラックスより大きい値となった。出芽酵母において、NAD(P)H は、Lot6 (flavin mononucleotide reductase、呼吸鎖の複合体 I の補欠分子族) によって酸化され、発生した電子はキノンに伝達されることが知られていることから (Sollner et al. 2009)、過剰な NADPH を、NADPH の酸化による ATP 生産に使用すると考えられた。

Table 2-7 NADPH 供給反応

反応式	酵素
G6P --> 6PG	glucose-6-phosphate dehydrogenase
6PG --> Ru5P + CO_2	phosphogluconate dehydrogenase
Mal --> Pyr_mit + CO_2	malic enzyme
IsoCit --> aKG + CO_2	isocitrate dehydrogenase

2. 4. 4. ATP バランス

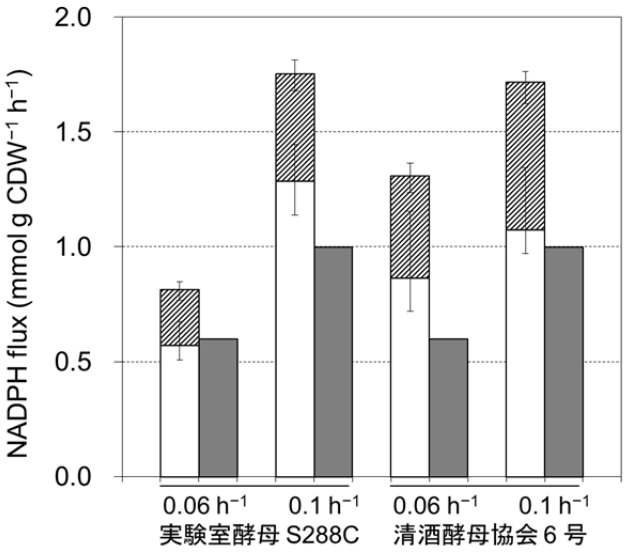
両希釈率条件において、清酒酵母協会 6 号の TCA 回路フラックスレベルは、実験室酵母 S288C と比較して増加していた (Fig. 2-6)。SAM 生合成には 1 mol あたり 13 mol の ATP が必要であるため、ATP 再生能の増加につながる TCA 回路フラックス向上は、SAM 生産と関連することが考えられた。この仮説を検証するため、ATP の供給フラックスと消費フラックスを比較した (Fig. 2-7b)。ATP 供給フラックスは、基質レベルのリン酸化と呼吸にかかわる代謝フラックスから算出した (Table 2-8)。細胞増殖に要する ATP 量は、先行文献値を用いて見積もった。希釈率 0.06 h^{-1} と 0.1 h^{-1} の条件で、ATP 供給フラックスと消費フラックスの差は、実験室酵母 S288C では、それぞれ 1.9 と 4.8 mmol g CDW^{-1} h^{-1} であるのに対して、清酒酵母協会 6 号では、4.0 と 6.4 mmol

g CDW^{-1} h^{-1} であった。これらの結果から、清酒酵母協会 6 号の ATP 供給フラックスと消費フラックスの差は、実験室酵母 S288C の 1.3 倍以上大きいことが分かった (Fig. 2-7b)。

Table 2-8 ATP 供給反応

反応式	酵素
ATP 生成反応	
GAP <--> PGA	phosphoglycerate kinase
PEP --> Pyr_cyt	pyruvate kinase
aKG --> Suc + CO_2	succinyl-CoA synthetase
NADH・$FADH_2$ 生成反応	
GAP <--> PGA	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Pyr_mit --> AcCOA_mit + CO_2	pyruvate dehydrogenase complex
aKG --> Suc + CO_2	oxoglutarate dehydrogenase complex
Suc <--> Mal	succinate dehydrogenase
Mal <--> Oxa_mit	malate dehydrogenase
AcAl --> Acetate	aldehyde dehydrogenase
AcCOA_cyt + Glyx --> Oxa_cyt	malate dehydrogenase

(a)



(b)

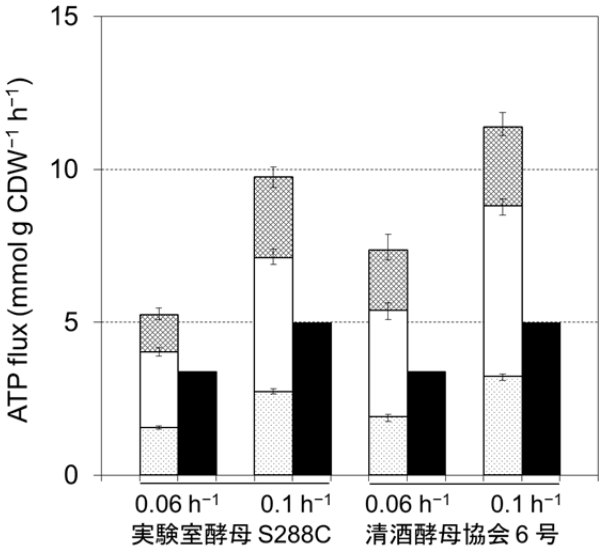


Fig. 2-7 酸化還元バランスとエネルギーバランス

希釈率 0.06 h^{-1} と 0.1 h^{-1} における実験室酵母 S288C と清酒酵母協会 6 号の (a) NADPH と (b) ATP バランス。(a) 白色と斜線バーはそれぞれ、G6P dehydrogenase と 6PG dehydrogenase による生産フラックスと、isocitrate dehydrogenase と malic enzyme による生産フラックスを表している。エラーバーは代謝フラックスの 90% 信頼区間を示す。薄灰色バーは細胞増殖必要量から導出した消費フラックスを示す。(b) 点付、白色、網目バーはそれぞれ、基質レベルのリン酸化、電子伝達系 (NADH、$FADH_2$)、電子伝達系 (NADPH) による生産フラックスを表している。エラーバーは代謝フラックスの 90% 信頼区間を示す。黒色バーは細胞増殖必要量から導出した消費フラックスを示す。

2. 5. 考察

本章では、清酒酵母の高 SAM 生産性に関与する代謝制御機構を調査するために、^{13}C-MFA により、清酒酵母協会 6 号 (SAM 高生産株) と実験室酵母 S288C (対照株) の中央代謝の代謝フラックス分布を比較した (Fig. 2-6) (Shiozaki et al. 1984)。SAM 生産に必要な前駆体や補因子の中では、オキサロ酢酸と NADPH の供給にかかわる代謝フラックスレベルは、両株でほぼ同様な値を示す一方、清酒酵母協会 6 号の TCA 回路フラックスは、実験室酵母 S288C よりも高い値を示すことが分かった (Fig. 2-6)。清酒酵母協会 6 号と 実験室酵母 S288C 株の炭素収支から見積もった CO_2 発生量の差によって、この結果を間接的に確認した (Table 2-4)。ATP バランス解析からも、清酒協会 6 号では、酸化的リン酸化活性の向上によって、より多くの過剰な ATP が再生されていることを示した (Fig. 2-7b)。一般的に清酒酵母は、実験室酵母と比較して、好気条件では TCA 回路、呼吸、酸化的リン酸化にかかわる遺伝子の発現量の多いことが知られている (Shobayashi et al. 2007b)。また、清酒酵母協会 6 号は他の清酒酵母の中でも呼吸活性が高い特徴を有している (Kasahara 1963)。これらの知見により、清酒酵母協会 6 号の SAM 高生産性には、高 TCA 回路フラックスと高呼吸活性による ATP 再生能の向上の関与が示唆された (Fig. 2-8)。それゆえ、SAM 生産性向上には、培養中の高呼吸活性維持が重要と考えられた。今後の課題として、炭素源の種類や培地組成、溶存酸素濃度などの培養条件検討、あるいは遺伝子改変による高呼吸活性株の育種が挙げられる。

推定した代謝フラックス分布によって、清酒酵母協会 6 号の呼吸活性が高い特徴を説明できたことから、実用酵母においても ^{13}C-MFA を適用できると考えられる (Fig. 2-7b)。^{13}C-MFA は高呼吸活性を指標とした新たな SAM 生産宿主のスクリーニング系としての活用が期待できる。

実験室酵母 S288C は 1 倍体 (*MATα*) であるが、協会 6 号を含む清酒酵母の多くは 2 倍体である (Mortimer et al. 1986)。Takagi らは、呼吸能欠損 (RD) 変異株の自然発生頻度への出芽酵母の倍数性の違いによる影響を報告している。1 倍体は 2 倍体よりも細胞内のミトコンドリア数が少ないため、1 倍体細胞では 2 倍体細胞よりも多くの RD 細胞が出現した (Takagi et al. 1985)。そのため、本章の ^{13}C-MFA で示したように、清酒酵母協会 6 号の倍数性 (2 倍体) は TCA 回路フラックスと ATP 供給フラックスの増加に寄与していると推定した。

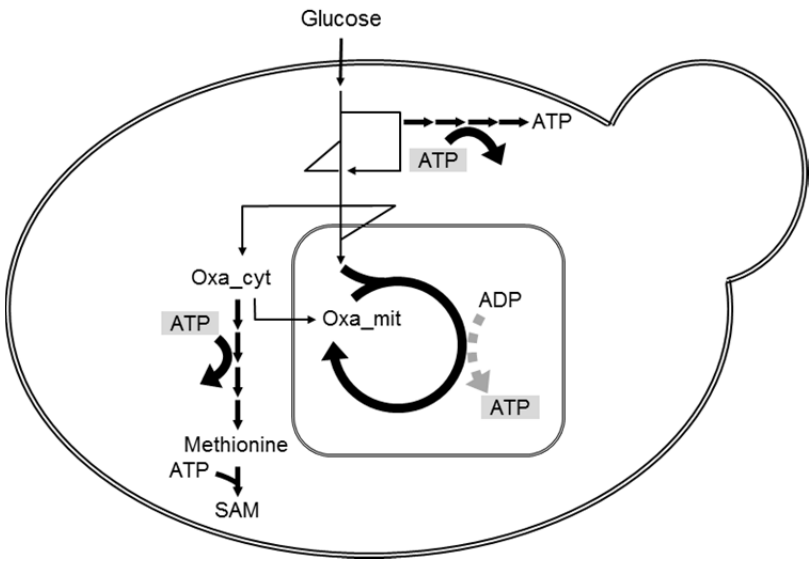
最近では、アルコール発酵中のミトコンドリア活性に着目した研究が行われている (Shiroma et al. 2014)。例えば、清酒酵母のミトコンドリア活性はアルコール発酵中のリンゴ酸やコハク酸生産に影響する (Motomura et al. 2012; Oba et al. 2014)。さらに、^{13}C-MFA とミトコンドリア形態解析によって清酒酵母協会 7 号の酸化的 TCA 回路活

性やミトコンドリア活性は実験室酵母より高いことが報告されている (Agrimi et al. 2014)。これらの結果は、本章の低比増殖速度 (希釈率) 条件においても清酒酵母の TCA 回路フラックスレベルが実験室酵母よりも高い結果と合致している。

ATP 再生能の向上は SAM 生合成活性化の駆動力となるが、清酒酵母協会 6 号における過剰な ATP 供給フラックスの全量が SAM 生産で消費されているわけではない。細胞質オキサロ酢酸から SAM への代謝フラックスは、グルコース消費フラックスの 0.02% 以下であることから (Fig. 2-6)、清酒酵母協会 6 号で過剰に供給されている ATP を、H^+ P-ATPase や H^+ V-ATPase などの ATP 依存トランスポーターによる増殖阻害物質の排出で消費していると考えられた (Piper 1985; Yoshikawa et al. 2009)。

ATP 再生能の向上に加えて、清酒酵母による SAM 高生産には、ATP から L-メチオニンへアデノシル基転移を触媒する methionine adenosyltransferase の高活性が関与していることが報告されており (Shiozaki et al. 1986)、それゆえ、ATP と L-メチオニンの供給が SAM 生産に影響する (Shiozaki et al. 1989)。清酒酵母の SAM 生産に関しては、その生合成に SAM を介したメチル基転移を必要とするエルゴステロールの生合成を阻害した変異株や、メチオニン合成能が向上した adenosine kinase (*ADO1*) 欠損変異株による SAM 生産性向上の取り組みが報告されている (Shobayashi et al. 2006; Kanai et al. 2013)。さらに、*Pichia pastoris* や *Candida utilis* においては、methionine adenosyltransferase 活性の向上や炭素源流加の最適化による細胞内 ATP レベルの向上による SAM 生産性向上が報告されている (Hu et al. 2007; Hu et al. 2008; Wang et al. 2013)。これらの取り組みや高呼吸活性維持のための培養条件の最適化検討を、本章の知見と組み合わせることで、出芽酵母を宿主とした、L-メチオニン無添加等の、より効率的な SAM 生産方法開発に活用できると考えている。

(a)



(b)

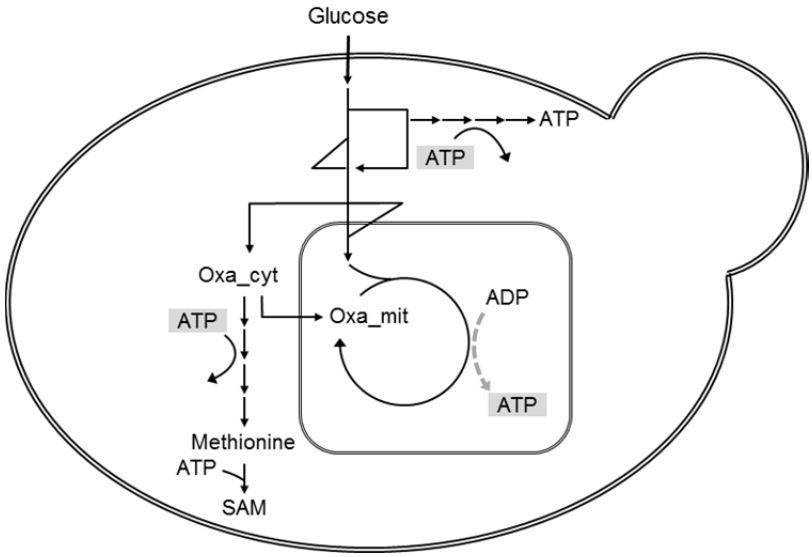


Fig. 2-8 SAM 高生産機構の仮説

(a) 高生産株・清酒酵母、(b) 実験室株。灰色点線は呼吸鎖を表す。^{13}C-MFA を用いて、高 TCA 回路フラックスと高呼吸活性に伴う ATP 供給量の向上によって、清酒酵母の SAM 高生産能力を説明できた。

第 3 章　*S*-アデノシル-L-メチオニン生産出芽酵母のエタノール資化における ^{13}C 代謝フラックス解析

3.1. Highlights

- エタノール資化による SAM 含量増加に関連する代謝経路を明らかにすることを目的とする。

- グルコースおよびエタノール資化における、SAM 高生産株の中央代謝系の代謝反応速度を比較し、エタノール資化によって活性化する代謝反応を探索するため、^{13}C-MFA を用いた。

- エタノール資化では、グルコースと比較して TCA 回路フラックスと酸化的リン酸化活性が高く、ATP 供給量と細胞増殖必要量の差も高い値を示した。

- SAM 生産性向上には、エタノール資化による ATP 供給量増加が重要と考えられた。

- エタノール資化では、SAM 高生産株が消費した炭素の約 40% が TCA 回路から CO_2 として排出されていた。

- CO_2 生成量抑制には、TCA 回路を迂回するグリオキシル酸経路のフラックス増加が重要と示唆された。

3. 2. 緒言

第 2 章では、実験室酵母と *S*-アデノシル-L-メチオニン (SAM) 高生産株・清酒酵母協会 6 号の中央代謝系の代謝フラックス分布を比較することによって、清酒酵母協会 6 号 の SAM 高生産能力は ATP 再生能の向上が関連する知見を見出すことができた。それゆえ、^{13}C-MFA を用いた代謝フラックス分布の推定は SAM 高生産に関連する代謝反応の探索に有効な手段と考えられた。第 3 章では、^{13}C-MFA を用いて、清酒酵母協会 6 号がエタノールを資化したときの代謝フラックス分布を推定し、グルコース資化の結果と比較することで、エタノール資化による SAM 含量増加に関連する代謝経路を探索した。

SAM 培養生産中にエタノールを添加すると SAM 含量が向上することが知られている (Shiozaki et al. 1986; Shiozaki et al. 1989)。しかしながら、生産宿主の細胞内代謝の改変によって SAM 生産性を向上させるために必要な、エタノール資化による SAM 含量増加に関連する代謝経路は明らかとなっていない。また、エタノールを炭素源とする場合の代謝フラックス解析自体に前例がなく、エタノールを資化している状態における出芽酵母の代謝状態は、代謝フラックスレベルでは不明である。一方で、この代謝経路は中央代謝系と SAM 生合成経路 (Fig 1-3) の中に存在すると予想できるため、グルコースおよびエタノールを資化したときの中央代謝フラックス分布を推定し、中央代謝系から供給される SAM 前駆体、NADPH と ATP 量を見積もることによって、エタノールとグルコース資化における代謝状態の差異を明らかにし、エタノール資化における代謝状態と SAM 含量増加の関連を調査することにした。

エタノールを資化することによって、グルコース資化時と比較して、活性化する代謝経路や、細胞内の酸化還元バランスとエネルギー状態が大きく変化すると考えられる。エタノール資化条件では SAM 前駆体、ATP や NADPH 供給速度が向上すると予測される。そのため、エタノールおよびグルコース資化における各代謝反応の反応速度を比較する必要がある。高い反応速度を示す代謝反応が SAM 含量増加に関連すると推定される。複数の代謝反応速度 (代謝フラックス) を同時に定量的に把握する必要があり、その手段として、第 2 章で述べたように ^{13}C-MFA が最も適していると考えられる。

また、エタノールは出芽酵母による物質生産の目的物質だけではなく、原料としても着目されていることから (de Jong et al. 2014)、エタノール資化における代謝フラックス分布を明らかにすることは、SAM 以外の有用物質の生産性向上に対しても重要な知見となると考えられる。

本章では、エタノールを単一炭素源および制限基質とする連続培養条件における、清酒酵母協会 6 号の中央代謝系の代謝フラックス分布を ^{13}C-MFA を用いて推定した。これまでにエタノールを炭素源とした ^{13}C-MFA の報告例がないことから、遺伝子およびタンパク質発現レベルの知見や第 2 章で得たグルコース資化の結果をもとに、推定

した代謝フラックス分布の妥当性を考察した。中央代謝系から供給される NADPH、ATP と SAM 前駆体量を見積もり、グルコース資化の結果と比較することで、SAM 含量増加に関連する代謝反応を探索した。また、原料 (炭素源) の利用効率向上に向けた代謝改変について考察した。

3. 3. 実験材料と実験方法

3. 3. 1. 使用菌株

本章では、NBRC から購入した清酒酵母協会 6 号 (NBRC2346) を用いた。

3. 3. 2. ^{13}C-MFA 培養条件

^{13}C-MFA に必要な細胞試料を取得するため、250 mL 容培養槽 (ABLE) を用いて液量 100 mL、好気的条件で、エタノールを制限基質としたケモスタット連続培養を行った。1.0 *N* NaOH の添加により、培養液の pH を 5.5 となるように制御した。また、培養温度 30 °C、撹拌速度 1,000 rpm、通気流量 200 mL min^{-1}、希釈率 0.06 h^{-1} に設定した。培養には合成培地 [3.83 g L^{-1} エタノール、5.0 g L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$、0.50 g L^{-1} K_2HPO_4、3.4 g L^{-1} yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate (Difco Laboratories)、2.0 g L^{-1} KH_2PO_4、1.5 g L^{-1} $MgSO_4$、2.5 mg L^{-1} $ZnSO_4$、2.4 mg L^{-1} $MnSO_4$、0.27 mg L^{-1} $CuSO_4$、0.20 g L^{-1} $CaCl_2$、4.0 mg L^{-1} $FeCl_3$、0.40 mg L^{-1} $NaMoO_4$ $2H_2O$、1.0 mg L^{-1} H_3BO_3、0.20 mg L^{-1} KI、0.20 g L^{-1} NaCl、34 µg L^{-1} biotin、1.6 mg L^{-1} Ca-pantothenate、13 mg L^{-1} inositol、7.8 mg L^{-1} thiamine-HCl、2.3 mg L^{-1} pyridoxine-HCl、0.40 mg L^{-1} para-aminobenzoic acid、0.40 mg L^{-1} riboflavin、0.80 mg L^{-1} niacin、4.0 µg L^{-1} folic acid] を用いた。^{13}C-MFA のため、炭素源としたエタノールを全て ^{13}C 標識エタノール (2-^{13}C エタノール) に置き換えた。エタノール分子骨格を形成する炭素原子のうち 2 位の炭素原子が ^{13}C で標識されているエタノールが 2-^{13}C エタノールである。培養槽から取得した培養液は、遠心分離 (18,800 × *g*、4 °C、5 分) で上清と細胞を分離した。上清は細胞外に排出された代謝物の定量分析に用いた。細胞は GC-MS による ^{13}C 濃縮度分析に用いた。

3. 3. 3. オフライン測定

細胞乾燥重量、SAM、各種有機酸、グルコースとエタノール濃度測定は、第 2 章の方法で行った。

3. 3. 4. タンパク質由来アミノ酸 GC-MS 分析

タンパク質由来アミノ酸 GC-MS 分析と天然存在同位体の影響補正は、前章の方法で行った。無限時間経過後のアミノ酸 ^{13}C 濃縮度は (2) 式を用いて導出した (van Winden et al. 2001)。

$$\chi(\infty) = \frac{\chi(t) - e^{-\mu t} \cdot \chi(0)}{1 - e^{-\mu t}} \qquad (2)$$

$\chi(\infty)$ は無限時間経過後のアミノ酸 ^{13}C 濃縮度、t は ^{13}C 標識炭素源を含む培地の流

加を開始してからの経過時間 (h)、$\chi(t)$ と $\chi(0)$ はそれぞれ t と ^{13}C 標識炭素源を含む培地の流加を開始した時点におけるアミノ酸 ^{13}C 濃縮度、μ は希釈率 (h^{-1}) である。

3. 3. 5. 代謝ネットワークモデル

本章で使用した代謝モデルは、前章で構築したモデルに、糖新生経路としてオキサロ酢酸からホスホエノールピルビン酸を合成する経路を加えた。オキサロ酢酸とアセチル-CoA からクエン酸を合成する反応を可逆反応とした。また、グリシン生合成経路は、先行知見により、前駆体をグリオキシル酸とセリンとした (Table 3-1) (Monschau et al. 1997)。エタノールを資化したときの出芽酵母細胞を構成するタンパク質、脂質、DNA、RNA、炭水化物の含量と組成は文献値を用いた (Table S2–5) (Förster et al. 2003; Stückrath et al. 2002)。これらのデータと同化代謝の反応式を用いて、細胞増殖に必要な前駆体量を推算し (Table 3-2)、^{13}C-MFA の束縛条件とした (Table 3-4)。

3. 3. 6. ^{13}C 代謝フラックス解析

代謝フラックスを導出するフィッティング計算は、専用プログラム OpenMebius のソフトウェア Python バージョンを用いて行った (Kajihata et al. 2014; Maeda et al. 2016)。タンパク質由来アミノ酸 ^{13}C 濃縮度の実験データとランダムに与えた代謝フラックス分布から計算的に予測されたデータを比較し、残差の二乗和が最小となるまで、24 個の独立フラックスの数値を変えて繰り返し計算を行った。さらに、CO_2 の ^{13}C 標識パターンはフラックス導出計算過程で独立的に最適値を求めた。非線形最適化計算には PyOpt 1.2 の SLSQP (sequential least squares programming) function を用いた (Perez et al. 2012)。フラックス導出計算には以下のアミノ酸フラグメントを用いた。M−57 フラグメント : Ala、Asp、Glu、Gly、Phe、Thr、M−85 フラグメント : Ala、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Pro、Thr、Val、M−159 フラグメント : Glu、Ile、Leu、Pro、Val、M302 フラグメント : Asp。各フラックスの 90% 信頼区間の算出は第 2 章と同様の手法により行った。

3. 3. 7. 細胞増殖と SAM 生合成に必要な NADPH と ATP 量の算出

細胞増殖に必要な NADPH は、Table S2–5 で示した細胞構成成分データと KEGG データベースを用いて算出した (グルコース資化 9.42 mmol g CDW^{-1}、エタノール資化 11.95 mmol g CDW^{-1})。細胞増殖と SAM 生合成に必要な ATP 量は第 2 章の方法で算出した。

Table 3-1 ^{13}C-MFA で使用した出芽酵母の代謝モデル

Flux_number	Reaction	Carbon atom transitions
r1	EtOH --> AcAl	AB --> AB
r2	AcAl --> Ac	AB --> AB
r3	Ac --> AcCOA_cyt	AB --> AB
r4	AcCOA_cyt --> AcCOA_mit	AB --> AB
r5	Oxa_mit + AcCOA_mit --> IsoCit	ABCD + EF --> DCBFEA
r6	IsoCit --> aKG + CO_2_in	ABCDEF --> ABCDE + F
r7	IsoCit --> Suc + Glxy	ABCDEF --> EDCF + AB
r8	Glxy + AcCOA_cyt --> Oxa_cyt	AB + CD --> ABDC
r9	aKG --> Suc + CO_2_in	ABCDE --> BCDE + A
r10	Suc --> Mal	ABCD --> ABCD
r11	Mal --> Suc	ABCD --> ABCD
r12	Mal --> Oxa_mit	ABCD --> ABCD
r13	Oxa_mit --> Mal	ABCD --> ABCD
r14	Oxa_mit --> Oxa_cyt	ABCD --> ABCD
r15	Oxa_cyt --> Oxa_mit	ABCD --> ABCD
r16	Oxa_cyt --> PEP + CO_2_in	ABCD --> ABC + D
r17	PEP --> Pyr_cyt	ABC --> ABC
r18	Pyr_cyt --> Pyr_mit	ABC --> ABC
r19	Pyr_cyt --> AcAl + CO_2_in	ABC --> BC + A
r20	Pyr_mit --> AcCOA_mit + CO_2_in	ABC --> BC + A
r21	Pyr_cyt + CO_2_in --> Oxa_cyt	ABC + D --> ABCD
r22	Mal --> Pyr_mit + CO_2_in	ABCD --> ABC + D
r23	PGA --> PEP	ABC --> ABC
r24	PEP --> PGA	ABC --> ABC
r25	GAP --> PGA	ABC --> ABC
r26	PGA --> GAP	ABC --> ABC
r27	DHAP --> GAP	ABC --> ABC
r28	GAP --> DHAP	ABC --> ABC
r29	F6P --> DHAP + GAP	ABCDEF --> CBA + DEF
r30	DHAP + GAP --> F6P	CBA + DEF --> ABCDEF
r31	G6P --> F6P	ABCDEF --> ABCDEF
r32	F6P --> G6P	ABCDEF --> ABCDEF
r33	Glc --> G6P	ABCDEF --> ABCDEF
r34	G6P --> 6PG	ABCDEF --> ABCDEF
r35	6PG --> Ru5P + CO_2_in	ABCDEF --> BCDEF + A
r36	Ru5P --> R5P	ABCDE --> ABCDE
r37	R5P --> Ru5P	ABCDE --> ABCDE
r38	Ru5P --> Xu5P	ABCDE --> ABCDE
r39	Xu5P --> Ru5P	ABCDE --> ABCDE
r40	R5P + Xu5P --> S7P + GAP	ABCDE + FGHIJ --> FGABCDE + HIJ
r41	GAP + S7P --> R5P + Xu5P	HIJ + FGABCDE --> FGHIJ + ABCDE
r42	GAP + S7P --> F6P + E4P	ABC + DEFGHIJ --> DEFABC + GHIJ
r43	E4P + F6P --> S7P + GAP	GHIJ + DEFABC --> DEFGHIJ + ABC
r44	E4P + Xu5P --> F6P + GAP	ABCD + EFGHI --> EFABCD + GHI

Table 3-1 ^{13}C-MFA で使用した出芽酵母の代謝モデル (続き)

Flux_number	Reaction	Carbon atom transitions
r45	GAP + F6P --> Xu5P + E4P	GHI + EFABCD --> EFGHI + ABCD
r46	Oxa_cyt --> Thr	ABCD --> ABCD
r47	PGA --> Ser	ABC --> ABC
r48	Ser --> Gly + CO_2_in	ABC --> AB + C
r49	Glxy --> Gly	AB --> AB
r50	Pyr_cyt --> pre_Ala	ABC --> ABC
r51	Pyr_mit --> pre_Ala	ABC --> ABC
r52	AcAl --> EtOH_ex	
r53	G6P --> [Biomass]	
r54	AcCOA_cyt --> [Biomass]	
r55	Gly --> [Biomass]	
r56	Ser --> [Biomass]	
r57	Oxa_cyt --> [Biomass]	
r58	R5P --> [Biomass]	
r59	E4P --> [Biomass]	
r60	GAP --> [Biomass]	
r61	PGA --> [Biomass]	
r62	PEP --> [Biomass]	
r63	pre_Ala --> [Biomass]	
r64	Pyr_mit --> [Biomass]	
r65	AcCOA_mit --> [Biomass]	
r66	aKG --> [Biomass]	
r67	Thr --> [Biomass]	
r68	Oxa_cyt --> SAM	
r69	Mal --> Mal_ex	
r70	Ac --> Ac_ex	
r71	Pyr_cyt --> Lac_ex	
r72	Pyr_cyt --> Pyr_cyt	
r73	IsoCit --> Cit_ex	
r74	Suc --> Suc_ex	
r75	DHAP --> Glyc_ex	
r76	CO_2 --> CO_2_in	A --> A
r77	CO_2_in --> CO_2_ex	A --> A
r78	IsoCit --> Oxa_mit + AcCOA_mit	DCBFEA --> ABCD + EF

CO_2_ex, 細胞外 CO_2; CO_2_in, 細胞内 CO_2; pre_Ala, Ala 前駆体;
[Biomass], 細胞構成成分

Table 3-2 細胞合成に必要な前駆体量 (μmol g CDW^{-1})

使用炭素源	エタノール
Glucose 6-phosphate	1950
Ribose 5-phosphate	293
Erythrose 4-phosphate	221
Glyceraldehyde 3-phosphate	126
Phosphoglycerate/Glyoxylate (for glycine)	308
Phosphoglycerate/Oxaloacetate (for glycine)	0
Phosphoglycerate (for others)	286
Phosphoenolpyruvate	419
Oxaloacetate (for threonine)	193
Oxaloacetate (for others)	674
Pyruvate (for alanine)	339
Pyruvate (mitochondrial, for others)	1269
Acetyl-CoA (cytosolic)	3433
Acetyl-CoA (mitochondrial)	278
α-ketoglutarate	1045

3. 3. 8. フラックスバランス解析 (FBA)

フラックスバランス解析 (FBA) は、代謝反応における量論係数と目的関数からなる代謝モデルを用いて線形計画法によって代謝フラックスを推定する手法である。本章では、代謝モデルとして出芽酵母のゲノムスケール代謝モデル iMM904 (Mo et al. 2009) を用いた。この代謝モデルは、904 遺伝子、1412 反応、1228 代謝物質より構成される。代謝モデル中の細胞増殖を表現する反応 (''Biomass'') を FBA における目的関数とした。''Biomass'' のフラックスが最大となるように各反応の代謝フラックスを決定した。FBA は先行文献 (Ohno et al. 2013) と同様の手法で行い、線形計画法を含むすべての数値計算にソフトウェア MATLAB と glpk (GNU Linear Programming Kit) を用いた。炭素源はグルコースとエタノールの混合基質とし、混合比率は炭素原子ベースで設定した。炭素原子比消費速度は 60 mmol g CDW^{-1} h^{-1} とした。酸素は、必要な分だけ消費できるとした (好気条件)。その他の細胞増殖に必要な栄養源 (CO_2、H_2O、H^+、NH_4^+、SO_4^{2-}、HPO_4^{2-}) は、細胞が自由に消費できるとした。

3. 4. 実験結果

3. 4. 1. ^{13}C 代謝フラックス解析 (^{13}C-MFA)

^{13}C-MFA に必要な炭素源比消費速度や生産物比生産速度データを取得するため、はじめに、好気条件で天然エタノールを制限基質として希釈率 0.06 h^{-1} のケモスタット連続培養を行った。培養実験結果を Table 3-3 に示した。エタノール資化における SAM 比生産速度と細胞内 SAM 含量は 0.27 µmol g CDW^{-1} h^{-1} と 1.8 mg g CDW^{-1} で、希釈率と単位液量あたりの炭素原子供給速度 (100 mmol L^{-1} h^{-1}) が同じ条件のグルコース資化連続培養 (0.089 µmol g CDW^{-1} h^{-1}、0.58 mg g CDW^{-1}) と比較して大きい値となった。エタノール資化の細胞収率はグルコース資化よりも低く、先行文献と合致していた (Daran-Lapujade et al. 2004; de Jong-Gubbels et al. 1995; Verduyn et al. 1991)。一方で、エタノール資化では酢酸収率が高く、acetaldehyde dehydrogenase をコードする *ALD4* と *ALD6* の転写量増加との関連が考えられた (Daran-Lapujade et al. 2004)。

次に、^{13}C-MFA で使用する細胞代謝物の ^{13}C 濃縮度測定試料を取得するため、同様の条件で ^{13}C 標識エタノールを制限基質としてケモスタット連続培養を行った。細胞増殖の定常を確認した 98 時間目に ^{13}C 標識エタノールを含む培地の流加を開始し、183 時間目まで培養を行った。細胞試料は、^{13}C 標識エタノール流加後、1.3、2.3、2.7、3.7、4.1、5.1 レジデンスタイム経過後に回収した。第 2 章と同様の手法で、タンパク質由来アミノ酸を構成する炭素の ^{13}C 濃縮度を測定した (Fig. 3-1、Fig. S2)。Fig. 3-1 に、Glx (Glu と Gln) と Phe の M−57 フラグメントの ^{13}C 標識パターンについて、各質量同位体の存在比の経時変化を示した。5.1 レジデンスタイムのデータを用いて、^{13}C 標識レベルで定常に達していると考えられる無限時間経過後の ^{13}C 濃縮度を求めた。本章では、無限時間経過補正した ^{13}C 濃縮度データを用いて、代謝フラックス分布を導出した。

本章の代謝ネットワークは第 2 章で使用した代謝モデルを修整したものを用いた (Table 3-1、Table S1)。代謝フラックス分布の推定は第 2 章と同様の手法で行った。実験的に得た ^{13}C 濃縮度と推定した代謝フラックス分布から求めた ^{13}C 濃縮度の差はとても小さく、推定した代謝フラックス分布は、実験的 ^{13}C 濃縮度データをよく説明できていると考えられた (Table S10)。最小の残差となる代謝フラックス分布をもとに、グリッドサーチ法を用いて、各代謝フラックスの 90% 信頼区間を求めた。

グルコースおよびエタノールを炭素源とした連続培養 (希釈率 0.06 h^{-1}) における清酒酵母協会 6 号の代謝フラックスの 90% 信頼区間を Fig. 3-2a (グルコース資化)と Fig. 3-2b (エタノール資化) に示した。また、細胞構成成分の合成フラックスは、どちらの条件も Table 3-4 に示した。グルコース資化 (グルコース比消費速度 0.65 mmol g CDW^{-1} h^{-1}) において、ペントースリン酸経路フラックス (G6P --> Ru5P + CO_2) は

Table 3-3 好気的炭素源制限ケモスタット連続培養実験結果 (希釈率 0.06 h^{-1})

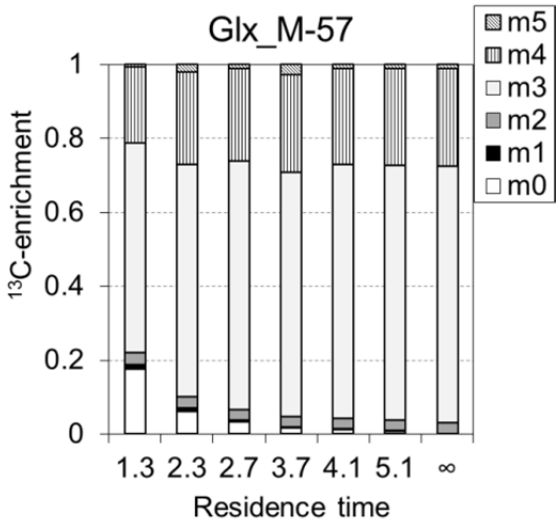
株	清酒協会酵母 6 号	
使用炭素源	グルコース[a]	エタノール
炭素源比消費速度 (mmol g CDW^{-1} h^{-1})	0.65	2.5
SAM 比生産速度 (μmol g CDW^{-1} h^{-1})	0.089	0.27
SAM 含量 (mg g CDW^{-1})	0.58	1.8
細胞収率 (g CDW mol C^{-1})	15	12
対炭素源収率 (mol 100 mol^{-1})		
SAM	0.014	0.011
リンゴ酸	0.55	0.17
酢酸	0.76	1.2
乳酸	0.91	0.061
ピルビン酸	0.0	0.011
クエン酸	0.21	0.018
コハク酸	0.65	0.21
グリセロール	0.053	0.017
エタノール	0.0	−
CO_2 (mol C mol C^{-1})[b]	0.41	0.54

1 回の培養実験で全データを得た。

[a] 第 2 章のデータを記載した。

[b] 比増殖速度と細胞中の炭素含量 (グルコース : 0.455 g g CDW^{-1}、エタノール : 0.467 g g CDW^{-1}) (Stückrath et al. 2002)、炭素源比消費速度、SAM 等生産物の比生産速度から算出した炭素収率から見積もった。炭素収率の合計は 1 とした。

(a)



(b)

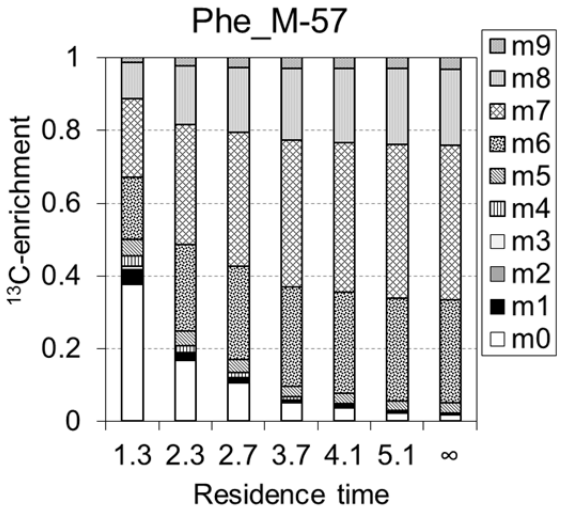


Fig. 3-1 清酒酵母協会 6 号のタンパク質構成アミノ酸 ^{13}C 濃縮度 (^{13}C-enrichment) 経時変化

(a) Glx と (b) Phe の M−57 (質量数が 57 減少したフラグメントイオン) を示した。Residence time (レジデンスタイム) は、^{13}C 標識エタノールの流加を開始した時点を 0 とした。m*n* は、*n* 個の ^{13}C 原子を含む質量同位体を表す。その他のアミノ酸は Fig. S2 に示した。

0.36–0.58 mmol g CDW^{-1} h^{-1} で、エタノール資化 (エタノール比消費速度 2.5 mmol g CDW^{-1} h^{-1}) では、0–0.25 mmol g CDW^{-1} h^{-1} となり、主に細胞構成成分の前駆体の供給に働くと考えられた。対照的に、グリオキシル酸経路フラックス (IsoCit --> Glxy + Suc と AcCOA_cyt + Glxy --> Oxa_cyt) は、グルコース資化では 0.007–0.03 mmol g CDW^{-1} h^{-1} で、ほとんど炭素が流れていないことを示したが、エタノール資化では 0.58–0.68 mmol g CDW^{-1} h^{-1} で大きく向上していた。エタノール資化ではグリオキシル酸とアセチル-CoA からリンゴ酸を生成する malate synthase の発現が必要であることから (Chen et al. 2012)、推定したフラックス値は同経路の活性化を示していると考えられた。Pyruvate carboxylase によるオキサロ酢酸を補充する代謝反応 (Pyr_cyt + CO_2 --> Oxa_cyt) フラックスの 90% 信頼区間は、どちらの炭素源においても炭素が流れている結果を示していた (グルコース資化 0.14–0.18 mmol g CDW^{-1} h^{-1}、エタノール資化 0.42–1.5 mmol g CDW^{-1} h^{-1})。エタノール資化におけるオキサロ酢酸の補充経路としてグリオキシル酸経路があり、pyruvate carboxylase 活性には ATP を必要とするが、エタノール資化において同酵素は活性を示すことから、当反応は活性化していると考えられた (de Jong-Gubbels et al. 1995)。また、TCA 回路の代謝フラックスは、資化する炭素源によって傾向が大きく異なっていた。イソクエン酸から 2-オキソグルタル酸を生成する反応 (IsoCit --> aKG + CO_2) とリンゴ酸からオキサロ酢酸を生成する反応 (Mal --> Oxa_mit) のフラックスレベルを比較すると、グルコース資化では 0.33–0.42 mmol g CDW^{-1} h^{-1} と 0.28–0.36 mmol g CDW^{-1} h^{-1} で、エタノール資化においては 0.91–1.1 mmol g CDW^{-1} h^{-1} と 0.85–1.0 mmol g CDW^{-1} h^{-1} であった。この結果は、エタノール資化ではグリオキシル酸経路で生成したコハク酸をオキサロ酢酸とするために、TCA 回路後半の反応 (Suc --> Mal と Mal --> Oxa_mit) のフラックスレベルが増加すると考えられた。

(a)

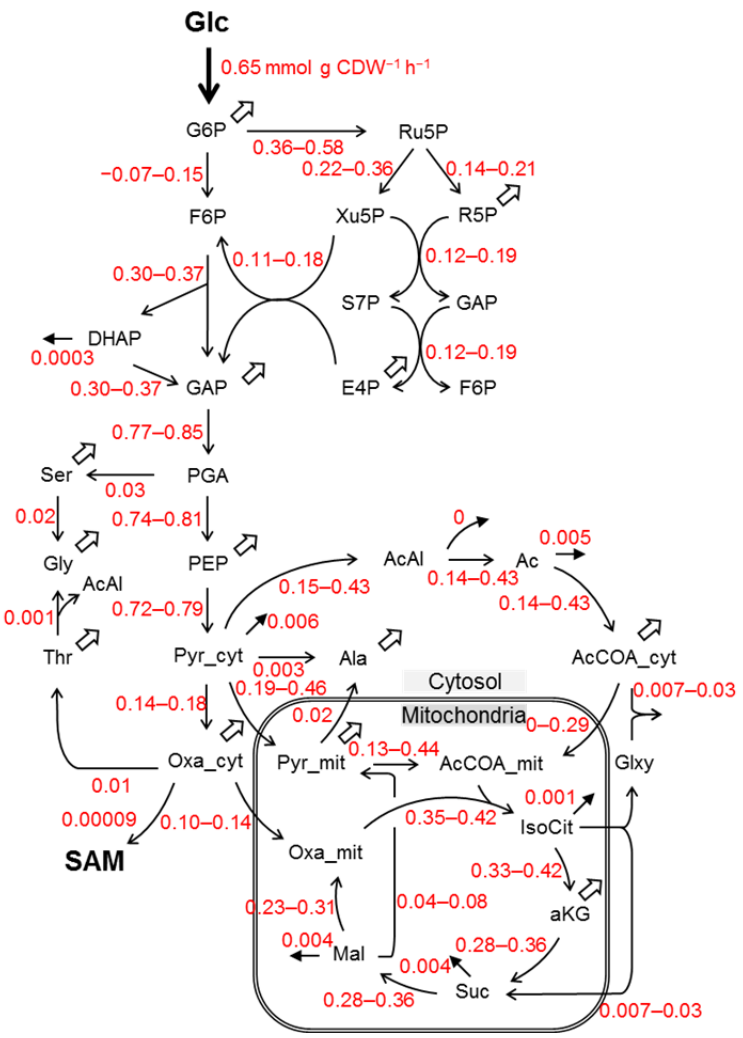


Fig. 3-2 清酒酵母協会 6 号の代謝フラックス分布 (希釈率 0.06 h^{-1})

(a) グルコース資化。中央代謝系の代謝フラックス値は 90% 信頼区間で示した。代謝中間体から細胞構成成分へ向かう同化代謝反応はブロック矢印で表し、各フラックス値を Table 3-4 で示した。

(b)

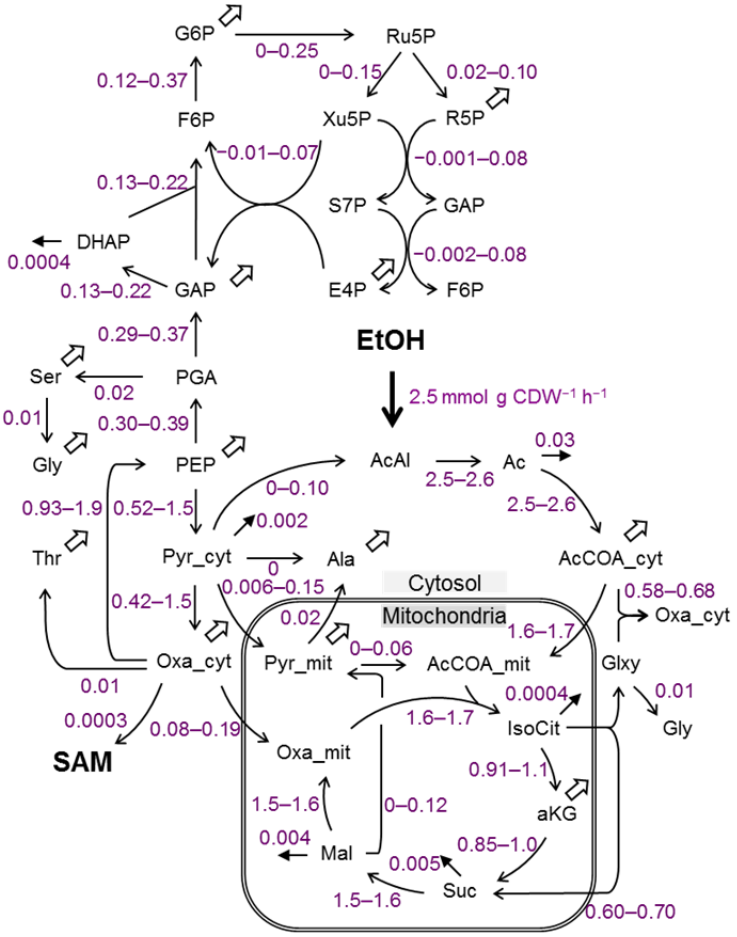


Fig. 3-2 清酒酵母協会 6 号の代謝フラックス分布 (希釈率 0.06 h^{-1}) (続き)
(b) エタノール資化。中央代謝系の代謝フラックス値は 90% 信頼区間で示した。代謝中間体から細胞構成成分へ向かう同化代謝反応はブロック矢印で表し、各フラックス値を Table 3-4 で示した。

Table 3-4 細胞構成成分の合成フラックス

	代謝フラックス (mmol g CDW^{-1} h^{-1})	
使用炭素源	グルコース [a]	エタノール
反応式		
G6P --> [Biomass]	0.14	0.12
AcCOA_cyt --> [Biomass]	0.13	0.21
Gly --> [Biomass]	0.023	0.024
Ser --> [Biomass]	0.010	0.011
Oxa_cyt --> [Biomass]	0.039	0.040
R5P --> [Biomass]	0.018	0.018
E4P --> [Biomass]	0.012	0.013
GAP --> [Biomass]	0.0048	0.0075
PGA --> [Biomass]	0.00027	0.00029
PEP --> [Biomass]	0.023	0.025
pre_Ala --> [Biomass]	0.019	0.020
Pyr_mit --> [Biomass]	0.071	0.076
AcCOA_mit --> [Biomass]	0.016	0.017
aKG --> [Biomass]	0.058	0.063
Thr --> [Biomass]	0.011	0.012

各前駆体から細胞構成成分へのフラックス値は Table 2-2 と Table 3-2 で示した値と下記式から求めた。

$$細胞構成成分合成フラックス = \frac{W}{1000} \times D$$

W は Table 2-2 および Table 3-2 で示した細胞構成成分の合成に必要な前駆体量 (μmol-metabolite g CDW^{-1})、D は希釈率 (h^{-1}) を表している。

[a] グルコース資化は清酒酵母協会 6 号の希釈率 0.06 h^{-1} の結果を示している。

3. 4. 2. 酸化還元バランス

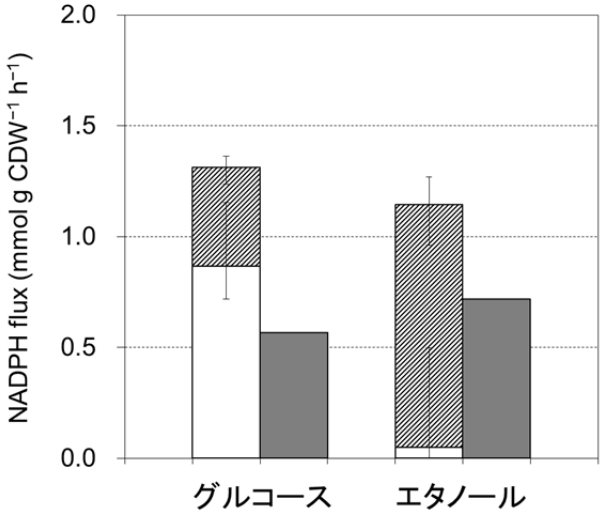
^{13}C-MFA によって、細胞質オキサロ酢酸から SAM 生合成経路へ流れるフラックス (0.0003 mmol g CDW^{-1} h^{-1}) は、エタノール消費フラックスの 0.01% であることを示した (Fig. 3-2b)。エタノール資化では、グリオキシル酸経路が活性化するため、グルコース資化と比較して細胞質オキサロ酢酸の流入フラックスは増加していた。しかし、流出フラックスである糖新生経路 (Oxa_cyt --> PEP + CO_2) の活性も増加することから、オキサロ酢酸が関連する代謝反応は中央代謝全体の代謝フラックス分布に影響しないと考えられた。そこで、補因子 (NADPH) およびエネルギー (ATP) 収支と SAM 生産性の関連を調査した。

代謝フラックス分布から導出した NADPH 供給フラックスと細胞増殖で使用する消費フラックスの比較により、NADPH バランスを調査した。グルコースと同様にエタノール資化では、SAM 生合成に必要な NADPH はペントースリン酸経路 (glucose-6-phosphate dehydrogenase と phosphogluconate dehydrogenase による反応)、malic enzyme と isocitrate dehydrogenase による反応から供給される (Table2-7)。エタノール資化では主に isocitrate dehydrogenase による反応から供給される結果となった。出芽酵母では資化する炭素源によって細胞構成成分の組成が異なることから、細胞増殖に必要な NADPH 量も変化した。エタノール資化のほうが細胞増殖に多くの NADPH を必要とするため、NADPH 消費フラックスもグルコースより増加していた。どちらの炭素源においても、NADPH は消費フラックスよりも過剰に供給されていた。その差はエタノール資化では 0.43 mmol g CDW^{-1} h^{-1}、グルコース資化が 0.75 mmol g CDW^{-1} h^{-1} となり、グルコースのほうが大きい値となった (Fig. 3-3a)。過剰な NADPH は、NADPH の酸化による ATP 生産に使用すると考えられた。

3. 4. 3. ATP バランス

第 2 章で示したように、清酒酵母協会 6 号の SAM 高生産には ATP 再生能の増加が関与していたことから (Fig. 2-7b)、エタノール資化とグルコース資化における、それぞれの ATP 供給フラックスと消費フラックスを比較した (Fig. 3-3b)。ATP 供給フラックスは、基質レベルのリン酸化と呼吸にかかわる代謝反応 [Table2-8 で示した反応と alcohol dehydrogenase による反応 (EtOH --> AcAl)] の代謝フラックスから算出した。ATP 消費フラックスは先行文献の細胞増殖に要する ATP 量 (グルコース資化 39.78 mmol g CDW^{-1}、エタノール資化 105.56 mmol g CDW^{-1}) を用いて求めた (Verduyn 1991)。ATP 供給および消費フラックスはエタノール資化のほうが大きい値を示した。また、ATP 供給フラックスと消費フラックスの差は 10.1 mmol g CDW^{-1} h^{-1} であり、グルコース資化 (3.2 mmol g CDW^{-1} h^{-1}) の 3 倍以上大きい値になると分かった (Fig. 3-3b)。

(a)



(b)

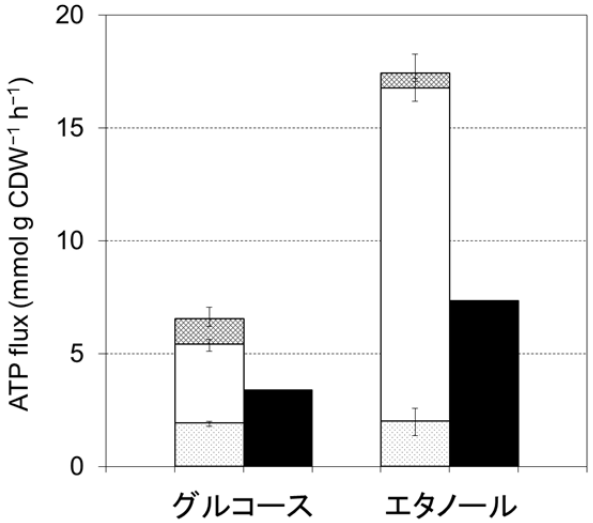


Fig. 3-3 酸化還元バランスとエネルギーバランス

エタノールおよびグルコースを炭素源とした希釈率 0.06 h^{-1} の連続培養における清酒酵母協会 6 号の (a) NADPH と (b) ATP バランス。(a) 白色と斜線バーはそれぞれ、G6P dehydrogenase と 6PG dehydrogenase による生産フラックスと、isocitrate dehydrogenase、malic enzyme による生産フラックスを表している。エラーバーは代謝フラックスの 90% 信頼区間を示す。薄灰色バーは細胞増殖必要量から導出した消費フラックスを示す。(b) 点付、白色と網目バーはそれぞれ、基質レベルのリン酸化、電子伝達系 (NADH、$FADH_2$) と電子伝達系 (NADPH) による生産フラックスを表している。エラーバーは代謝フラックスの 90% 信頼区間を示す。黒色バーは細胞増殖必要量から導出した消費フラックスを示す。

3. 4. 4. フラックスバランス解析 (FBA)

FBA は、代謝反応における量論係数と目的関数からなる代謝モデルを用いて線形計画法によって代謝フラックスを推定する手法である。本章では、様々な比率で混合したグルコースとエタノールを炭素源とし、炭素原子比消費速度 60 mmol g CDW^{-1} h^{-1} の条件で、細胞増殖が最大となるときの ATP および CO_2 比生産速度、比増殖速度と酸素比消費速度を予測した。これらの比速度の炭素原子比消費速度に対する割合 (生産および細胞増殖では収率を表す) を Fig. 3-4 に示した。炭素源中のエタノール比率が大きくなると、ATP 収率および酸素消費割合が上昇する結果となったことから、エタノール比率の増加によって ATP 再生能が向上すると示唆された。また、^{13}C-MFA を用いてグルコース資化 (エタノール比率 0 mol C mol C^{-1}) およびエタノール資化 (同 1 mol C mol C^{-1}) 条件の ATP 供給フラックスを比較した結果 (Fig. 3-3b) と一致していた。それゆえ、その間の比率においては、FBA によって実験結果の傾向が予測できており、FBA を用いて、エタノール比率に対する ATP 収率等の代謝フラックスの変化を議論することが可能と考えられる。

エタノール資化 (エタノール比率 1 mol C mol C^{-1}) 条件における FBA による推定値について、ATP 収率は ^{13}C-MFA から算出した値よりも低く、CO_2 収率は培養実験結果よりも低く、細胞収率は逆に高くなっていた。また、FBA 結果は、炭素源条件によらず、細胞の維持に必要な ATP 量は一定で、生産した全ての ATP が細胞増殖のために消費されると推定していた。従って FBA では、実際には CO_2 として生産されるはずの炭素が細胞増殖に使用され、CO_2 生成反応の代謝フラックスはその分低くなるように推定されたと考えられる。ATP 再生に関与する代謝反応は CO_2 生成を伴うものが多い (Table 2-7、2-8)。そのため、エタノール資化条件の FBA では、ATP 収率が ^{13}C-MFA から算出した値より低く見積もられたと考えられる。物質生産性に対して ATP 収率が大きく寄与する場合は、^{13}C-MFA で示した細胞内代謝フラックス分布の方が適しており、細胞増殖が必要な場合には、代謝フラックス分布を FBA 結果に近付ける育種が重要と示唆された。

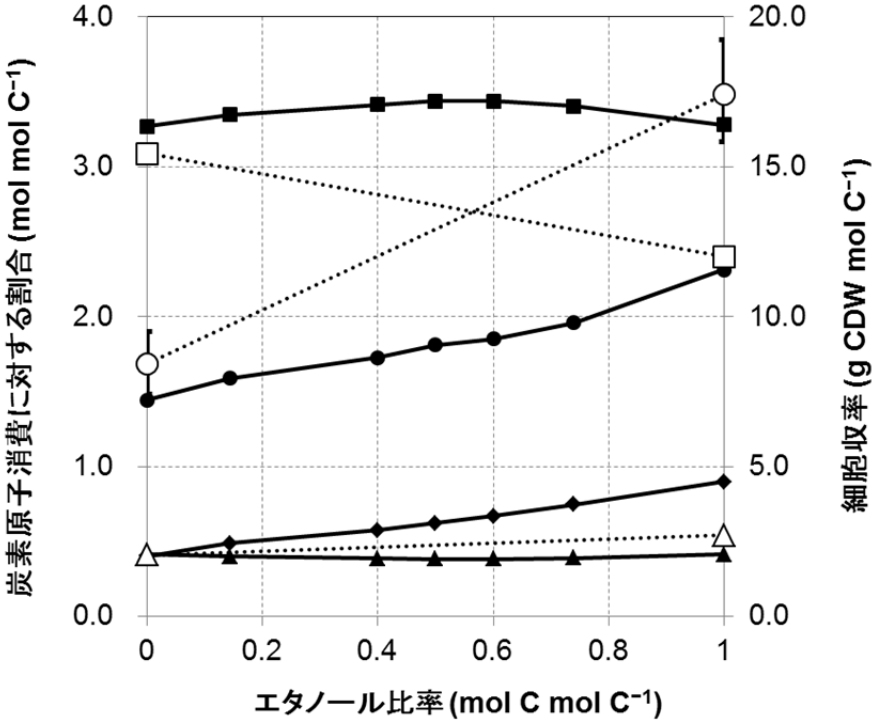


Fig. 3-4 グルコースとエタノール混合比率に対する ATP 収率、CO_2 収率、細胞収率と酸素消費割合の予測値と実験値

横軸は炭素源中の炭素原子のうち、エタノール由来のものの割合を表している。左縦軸は炭素原子比消費速度に対する ATP および CO_2 比生産速度の割合 (収率) および酸素比消費速度の割合を表している。右縦軸は炭素原子比消費速度に対する比増殖速度の割合 (細胞収率) を表している。クローズシンボルは FBA を用いた ATP 収率 (●)、CO_2 収率 (▲)、細胞収率 (■) と酸素消費割合 (◆) の予測結果である。オープンシンボルは、^{13}C-MFA を用いて算出した ATP 収率 (○)、連続培養実験から得た CO_2 収率 (△) と細胞収率 (□) を表している (Fig. 3-3b、Table 3-2)。エラーバーは 90% 信頼区間を示している。

3. 5. 考察

本章では、^{13}C-MFA により、グルコースおよびエタノール資化における清酒酵母協会 6 号 (SAM 高生産株) の中央代謝の代謝フラックス分布を比較し、エタノール資化の SAM 高含量に関与する代謝経路を探索した (Fig. 3-2) (Shiozaki et al. 1986; Shiozaki et al. 1989)。炭素源消費フラックスに対するペントースリン酸経路の代謝フラックスレベルはグルコース資化の方が高く、NADPH 供給フラックスもグルコース資化の方が大きい値を示した (Fig. 3-2、3-3a)。一方で、ATP バランス解析により、エタノール資化では、酸化的リン酸化活性の向上によって、より多くの過剰な ATP が再生されていることを示した (Fig. 3-3b)。エタノールを炭素源として増殖する場合、酢酸からアセチル-CoA への生成 (Ac --> AcCOA_cyt) や糖新生反応 (Oxa_cyt --> PEP + CO_2) で ATP を必要とするため、ATP 再生能が活性化すると考えられた (Verduyn et al. 1991)。

グルコースおよびエタノールを単一炭素源として培養した出芽酵母のトランスクリプトーム解析では、エタノールの方が、糖新生、グリオキシル酸経路やアセチル-CoA の膜輸送にかかわる遺伝子発現量は高く、ペントースリン酸経路にかかわる遺伝子発現量は低いことが報告されている (Daran-Lapujade et al. 2004)。グルコースおよびエタノール資化における炭素源消費フラックスに対する代謝フラックスレベルを比較すると、エタノール資化ではグリオキシル酸経路が高く、ペントースリン酸経路は低いことから、推定した代謝フラックス分布は転写レベルでの代謝制御によって説明できると考えられたことから、^{13}C-MFA で推定した代謝フラックス分布は出芽酵母の代謝状態の定量的な評価と示唆された。また、エタノール資化では、酸素比消費速度がグルコース資化と比較して高いことから (Daran-Lapujade et al. 2004; Stückrath et al. 2002)、エタノール資化による SAM 含量の増加は、酸化的リン酸化活性の向上による ATP 再生能の増加が関与すると考えられた。そのため、SAM 生産量向上には呼吸活性向上が重要と示唆された。その手段として、呼吸系酵素発現量向上やミトコンドリア活性向上 (分裂促進・呼吸阻害耐性向上) 等の生産株の代謝改変と、炭素源の最適化や溶存酸素濃度制御等の培養条件改良が考えられる。細胞質オキサロ酢酸から SAM へのフラックスはエタノール消費フラックスの 0.01% (0.27 μmol g CDW^{-1} h^{-1}) であり (Fig. 3-2b)、過剰な ATP 供給フラックス (10.1 mmol g CDW^{-1} h^{-1}) は SAM 生産での消費フラックス (3.5 μmol g CDW^{-1} h^{-1}) よりもかなり大きい。アセトアルデヒドや酢酸からのストレス応答等で、過剰に供給されている ATP を消費していると考えられた (Caspeta et al. 2015; Tuma and Casey 2003)。一方で、細胞収率と各生産物収率から推定した CO_2 収率はエタノール資化のほうが高いことから (Table 3-2)、CO_2 を生成する代謝反応のフラックスを減少させることで、さらなる SAM 生産の効率化を期待できる。^{13}C-MFA によって、エタノール資化では TCA 回路において 1.8–2.1 mmol g CDW^{-1} h^{-1} で CO_2 を生成して

いると示された (Table 3-5)。すなわち、細胞が消費した炭素の 35–43% を TCA 回路で排出していることから、TCA 回路の CO_2 生成反応 (IsoCit --> akG + CO_2 と aKG --> Suc + CO_2) を迂回し、CO_2 の生成を伴わないグリオキシル酸経路 (IsoCit --> Glxy + Suc と Glxy + AcCOA_cyt --> Oxa_cyt) の活性を向上させることにより、CO_2 収率の減少と、それに伴う SAM 収率の向上の可能性が考えられる。*E. coli* では、グリオキシル酸経路に関与する遺伝子の発現を抑制する isocitrate lyase レギュレーター (IclR) をコードする *iclR* 遺伝子破壊株は、野生株と比較して CO_2 収率が減少し、グリオキシル酸経路の代謝フラックスが増加した報告がある (Waegeman et al. 2011)。

出芽酵母を宿主とした、脂肪酸エチルエステル (バイオディーゼル) や amorpha-4,11-diene (マラリア治療薬アルテミシニン前駆体) 等のアセチル-CoA を前駆体とする有用物質の培養生産において、エタノール代謝経路が細胞質アセチル-CoA 供給反応として着目されている (de Jong et al. 2014; Westfall et al. 2012)。また、エタノールは非発酵性炭素源であることから、糖類を炭素源として培養したときと比較して副生産物生成量が少ないと考えられている (Nielsen et al. 2013)。一方で、エタノールからアセチル-CoA の生成反応では 3 種類の酵素 (alcohol dehydrogenase、acetaldehyde dehydrogenase、acetyl-CoA synthase) 活性が関与し、acetyl-CoA synthase による酢酸からアセチル-CoA への反応では 1 分子の生成で 2 分子の ATP を消費するため、細胞収率の最大化への制限や、生合成に ATP を必要とする生産物の収率低下が課題とされている (de Kok et al. 2012)。ATP 非依存酵素を用いてアセトアルデヒドからアセチル-CoA を生成する代謝反応を導入することで、細胞収率が上昇する結果が報告されている (Kozak et al. 2016)。^{13}C-MFA によってエタノール資化では ATP 再生能が活性化していると示唆されたことから、このような ATP 消費効率化の手段による、物質生産性の向上効果も期待できる。それゆえ、SAM 以外の物質生産に対しても、高生産に関連する代謝経路の探索手段として、本章で用いた ^{13}C-MFA 技術が寄与すると考えている。

Table 3-5 二酸化炭素生成反応の代謝フラックス

反応式	代謝フラックス (mmol g CDW^{-1} h^{-1})	炭素原子比消費速度に対する比率
IsoCit --> aKG + CO_2	0.91−1.1	18−22%
aKG --> Suc + CO_2	0.85−1.0	17−21%
Oxa_cyt --> PEP + CO_2	0.93−1.9	19−37%
Pyr_cyt --> AcAl + CO_2	0.0−0.10	0−2%
Pyr_mit --> AcCOA_mit + CO_2	0.0−0.055	0−1%
Mal --> Pyr_mit + CO_2	0.0−0.12	0−2%
6PG --> Ru5P + CO_2	0.0−0.25	0−5%

第 4 章　出芽酵母のメタボローム解析と *S*-アデノシル-L-メチオニン生産培地組成の最適化

4. 1. Highlights

- SAM 生産の律速段階 (ボトルネック) を明らかにすることを目的とする。
- 細胞内代謝物濃度を網羅的に定量することによって蓄積や欠乏している代謝物を探索するために、メタボローム解析を用いた。
- SAM 高生産株は、対照株より細胞内 ATP 濃度が高く、L-メチオニンを用いた高生産条件では、ATP とその生合成経路中間体の細胞内濃度が低下していた。酵母エキス制限によって細胞増殖を抑制すると、細胞内 ATP 濃度と SAM 生産量が増加した。
- SAM 高生産には、L-メチオニン以外に ATP 供給量向上も関与し、増殖活性低下等の細胞内 ATP 消費の効率化が有効と考えられた。
- L-メチオニンを用いた条件では、メチオニンサルベージ経路中間体の細胞内濃度が増加していた。
- SAM 分解抑制には当経路フラックスの低下が重要と示唆された。

4. 2. 緒言

第 2、3 章では、清酒酵母の SAM 高生産能力およびエタノール資化による SAM 含量増加に ATP 再生能の向上が関連すると示唆された。また、宿主スクリーニング系としての ^{13}C-MFA の活用や SAM 収率向上に向けた代謝改変戦略を見出した。それゆえ、代謝フラックス分布の推定は SAM 高生産に関連する代謝経路の探索あるいは評価に効果的な手段と考えられた。SAM 生産の律速段階 (ボトルネック) の解消も高生産に対して有効な戦略と考えられる。しかし、SAM 生産におけるボトルネックは明らかとなっていない。そこで第 4 章では、CE-TOFMS によるメタボローム解析を用いて、様々な SAM 生産条件おける出芽酵母の細胞内の代謝物濃度を網羅的に測定することによって、SAM 生産におけるボトルネックを探索した。

ボトルネックとなる反応は Fig 1-3 で示した代謝経路に存在し、基質となる代謝物が蓄積していると予測できる。SAM 生産性が異なる培養条件で各代謝物の細胞内濃度を比較し、SAM 高生産条件において濃度が高い代謝物を基質とする代謝反応を探索する必要がある。上記代謝経路 (Fig. 1-3) を構成する中間代謝物は極性を持つものが多く、これらを網羅的に定量する技術として、CE-TOFMS によるメタボローム解析が最も適していると考えられる。

これまで SAM 含量向上の取り組みとして、遺伝子変異原あるいは組換え技術を用いた育種が行われてきた。エチオニン耐性遺伝子増強株の SAM 含量は対照株の 20 倍以上となった (Shiomi et al. 1990)。エルゴステロール合成欠損のナイスタチン耐性変異株では対照株の 3 倍以上の生産量で、含量は 70 mg g CDW^{-1} に達した (Shobayashi et al. 2006)。メチオニンサルベージ経路の adenosine kinase (*ADO1*) 破壊株の含量は 18 mg g CDW^{-1} で親株の 26 倍となった (Kanai et al. 2013)。一方で、遺伝子組換え技術の適用による SAM 生産株の代謝改変は食品工業生産においては好ましい手法ではないと考えられる。他の代謝改変方法として培養条件の最適化が挙げられる。培地への L-メチオニン添加は SAM 高生産に対して効果的な手法である (Shiozaki et al, 1984; Shobayashi et al, 2007a)。第 2、3 章で示したように、ATP 再生能の向上は SAM 高生産能力あるいは含量増加に関与することから、通気撹拌条件も重要な因子と考えられる。また、培地組成の改良も、SAM 高生産に関与する代謝経路の代謝フラックス変化への効果を期待できる。

本章では、様々な SAM 生産条件下における出芽酵母の細胞内の代謝物濃度を比較し、その結果を用いて培地組成の最適化を行った。まず、CE-TOFMS を用いたメタボローム解析によってアミノ酸、糖リン酸、有機酸、ヌクレオチドを含む 75 種類の代謝物の細胞内濃度を測定し、主成分分析によってデータを解析した。この結果に基づいて SAM 生産のボトルネックを推定し、ボトルネックを解消するように培地組成を改良した。

4. 3. 実験材料と実験方法

4. 3. 1. 使用菌株

本章では、NBRC から購入した、実験室酵母 S288C (NBRC1136)、清酒酵母協会 6 号 (NBRC2346) を用いた。

4. 3. 2. 培養方法

前培養として、4 mL の半合成培地 [50.0 g L^{-1} D-グルコース、10.0 g L^{-1} ペプトン (Polypepton、Nihon pharmaceutical)、5.0 g L^{-1} 酵母エキス (Bacto Yeast Extract、Difco Laboratories)、4.0 g L^{-1} KH_2PO_4、2.0 g L^{-1} K_2HPO_4、0.50 g L^{-1} $MgSO_4$•$7H_2O$、pH 6.2] に凍結ストックから植菌し、30 °C、24 時間、200 rpm で振とう培養した。

本培養は、1% の前培養液を 4 mL の上記組成培地と、1.5 g L^{-1} となるように L-メチオニンを添加した同培地に植菌し、それぞれ 30 °C、24 時間、200 rpm で振とう培養した。培養は 3 回行った。

4. 3. 3. オフライン測定

細胞乾燥重量、SAM、グルコースとエタノール濃度測定は、第 2 章の方法で行った。細胞内 ATP 濃度測定は、以下のように行った。孔径 0.45 μm のメンブレンフィルター (JHWP02500、Merck) を用いた吸引ろ過によって培養した細胞を回収し、超純水で 2 回洗浄した。フィルターを液体窒素で凍結した後、18 時間真空乾燥した。乾燥細胞を 1 mL 超純水中に懸濁し、95 °C で 10 分間加熱し、ATP を抽出した (Ando et al. 2006)。遠心分離 (18800 × *g*、4 °C) で回収した上清中の ATP 濃度を Fluorometric & Colorimetric ATP Quantitation Kit (PromoCell) と分光光度計で測定した。

4. 3. 4. メタボローム解析

細胞内代謝物濃度は参考文献 (Nugroho et al. 2015; Yoshikawa et al. 2013) に従って CE-TOFMS によって測定した。孔径 0.4 μm のメンブレンフィルター (HTTP04700、Merck) を用いた吸引ろ過によって培養した細胞を回収し、10 mL の超純水で 2 回洗浄した。1 μL の内部標準液 (H3304-1002、Human Metabolome Technologies) を含む 2 mL メタノールにフィルターを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、超音波洗浄装置で 30 秒間処理した。フィルターを除去後、リン脂質を除くため、1.6 mL のクロロホルムと 0.4 mL の超純水を加えた。ボルテックスで 30 秒間混合した後、遠心分離 (4600 × *g*、5 分、4 °C) に供し、水層を除タンパクのため、限外ろ過フィルター UltrafreeMC-PLHCC 250 (Human Metabolome Technologies) でろ過した (9100 × *g*、4 °C)。ろ液を減圧乾燥した後、CE-TOFMS 分析のため、0.625 μL の移動時間補正用の内部標準液 second internal standard solution (H3304-1004、Human Metabolome

Technologies) を含む 25 μL の超純水でペレットを懸濁し、CE-TOFMS 分析に供した。試料は、Agilent 7100 CE system と Agilent 6224 TOF-MS (Agilent Technologies) で分析した。抽出用メタノール中の各代謝物濃度の算出には、試料分析結果から求められる各代謝物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混合液 (H3304-3032、Human Metabolome Technologies) の測定で得られた相対ピーク面積を用いた。ピーク面積は MassHunter software for qualitative analysis (Agilent Technologies) を用いて取得した。抽出用メタノールの代謝物濃度と乾燥細胞重量濃度から、細胞重量あたりの代謝物量を算出した。メタボローム解析データは、多変量解析ソフトウェア Mass Profiler Professional (Agilent Technologies) で主成分分析を行った。

4. 4. 実験結果

4. 4. 1. SAM 生産における培養条件の影響

Fig 1-3 で示したように、メチオニンと ATP は、出芽酵母における SAM 生合成の前駆体である。1.5 g L^{-1} L-メチオニン添加による出芽酵母の SAM 含量向上が知られており (Shiozaki et al. 1984; Shobayashi et al. 2007a)、メチオニン供給が SAM 生合成におけるボトルネックと示唆されている。SAM 生産へのメチオニン添加の影響を確認するため、対照株 (実験室酵母 S288C) と SAM 高生産株 (清酒酵母協会 6 号) を L-メチオニン無添加培地と添加培地で培養した。グルコースを完全に消費した 24 時間後に細胞を回収し、培養液の乾燥細胞重量、SAM、エタノール濃度をそれぞれ測定した。培養実験結果は Table 4-1 に示した。

培養実験結果を比較すると、清酒酵母協会 6 号の細胞内 SAM 含量は、L-メチオニン無添加培地では 1.1 mg g CDW^{-1} で、添加培地では 31.8 mg g CDW^{-1} となり、約 28 倍向上した。また、L-メチオニン添加によりエタノール生産量も増加する一方、細胞増殖と培養液 pH は低下していた。また、L-メチオニン添加培地における清酒酵母協会 6 号の SAM 含量は、実験室酵母 S288C 株 (12.5 mg g CDW^{-1}) の約 2.5 倍であった。以上の結果から、メチオニン添加により、エタノールと SAM 生産量が向上するように細胞内代謝が変化していると示唆された。

Table 4-1 L-メチオニン無添加・添加条件における培養実験結果

細胞株	清酒酵母協会 6 号		実験室酵母 S288C	
L-メチオニン	−	+	−	+
SAM 生産量 (mg L^{-1})	7.5 ± 0.4	177.6 ± 4.0	6.3 ± 0.1	62.6 ± 0.9
乾燥細胞重量濃度 (g CDW L^{-1})	6.7 ± 0.04	5.6 ± 0.06	5.5 ± 0.05	5.0 ± 0.05
SAM 含量 (mg g CDW^{-1})	1.1 ± 0.01	31.8 ± 1.0	1.1 ± 0.01	12.5 ± 0.2
エタノール生産量 (g L^{-1})	17.8 ± 0.5	20.0 ± 0.1	19.5 ± 0.2	20.7 ± 0.1
pH	5.7 ± 0.02	5.3 ± 0.05	6.0 ± 0.03	5.4 ± 0.03

数値は 3 回の培養実験の平均値と標準偏差を表している。

4. 4. 2. 細胞内代謝物濃度に及ぼす L-メチオニンの効果

メタボローム解析により、SAM 生産量が異なる条件で培養した出芽酵母の代謝状態を比較した。培養開始後 24 時間経過した出芽酵母細胞から代謝物を抽出した。アミノ酸、糖リン酸、有機酸、ヌクレオチドを含む 75 種類の代謝物の細胞内濃度を

CE-TOFMS で測定した (Table S11)。メチオニンサルベージ回路と、解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路の各中間体、補酵素、アミノ酸データは、Fig. 4-1 と Fig. 4-2 にそれぞれ示した。

Fig. 4-1 と Fig. 4-2 データの白色グラフ (清酒酵母協会 6 号・メチオニン無添加) と黒色グラフ (清酒酵母協会 6 号・メチオニン添加) の比較により、SAM 高生産株 (清酒酵母協会 6 号) における L-メチオニン添加の影響を調べた。メチオニン無添加条件での清酒酵母協会 6 号のメタボローム解析では、細胞内で微量なメチオニンを検出した (0.06 μmol g CDW^{-1}、Fig. 4-1)。相対的に ATP を多く蓄積していた (13.6 μmol g CDW^{-1}、Fig. 4-1) ことから、SAM 生合成のボトルネックは ATP ではなく、L-メチオニン供給と考えられた。

1.5 g L^{-1} L-メチオニンの添加により、細胞内メチオニン濃度は 400 倍向上したことから (28.2 μmol g CDW^{-1}、Fig. 4-1)、L-メチオニン枯渇によるボトルネックを解消できたと考えられた。メタボローム解析結果から、SAM 生産量の増加に加えて (Table 4-1)、

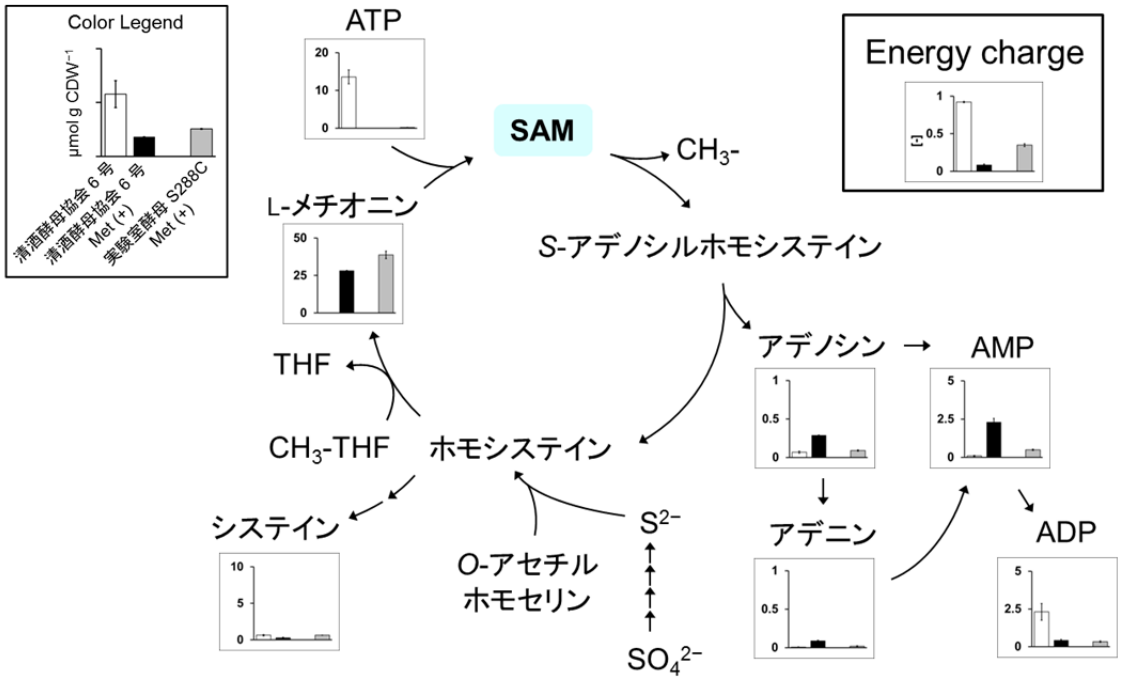


Fig. 4-1 メチオニンサルベージ回路とメタボローム解析結果

白色グラフは L-メチオニン無添加の清酒酵母協会 6 号、黒色と灰色グラフは L-メチオニン添加の清酒酵母協会 6 号と実験室酵母 S288C を表している。エネルギーチャージ以外の縦軸は細胞内代謝物濃度を示し (μmol g CDW^{-1})、数値は 3 回の培養実験の平均値を、エラーバーは標準偏差を表している。

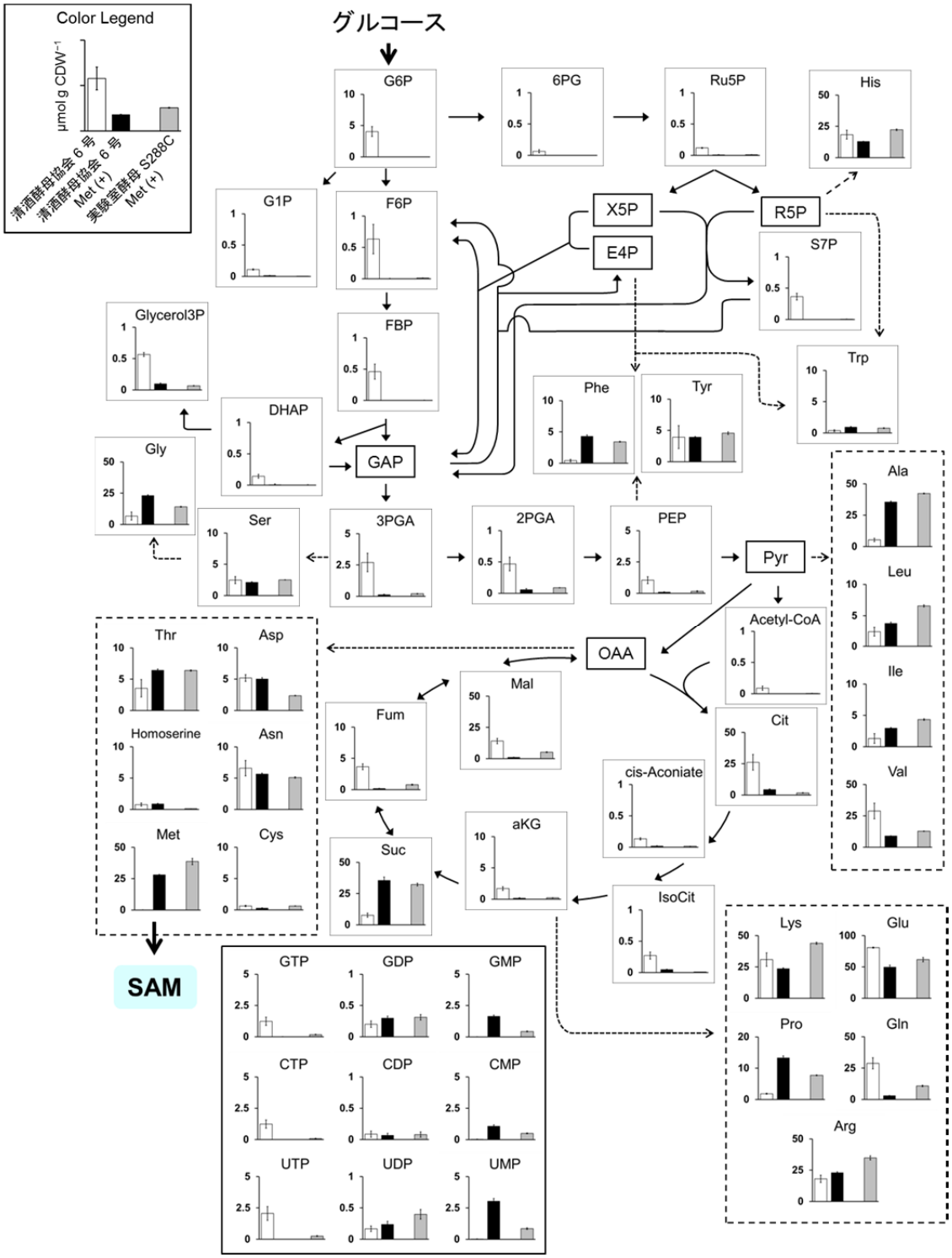


Fig. 4-2 中央代謝経路のメタボローム解析結果

白色グラフは L-メチオニン無添加の清酒酵母協会 6 号、黒色と灰色グラフは L-メチオニン添加の清酒酵母協会 6 号と実験室酵母 S288C を表している。数値は 3 回の培養実験の平均値を、エラーバーは標準偏差を表している。

L-メチオニン添加による清酒酵母協会 6 号の代謝状態の大きな変化を見出した。例えば、L-メチオニン添加によって、細胞内のコハク酸レベルが著しく向上する一方で、解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路のほぼすべての中間体の蓄積量が明らかに減少していた。この結果と、エタノール生産量増加を伴う基質レベルのリン酸化の活性化 (Table 4-1) と合わせて、何らかの要因で L-メチオニン添加による解糖系と酸化的リン酸化への阻害が示唆された。このことは、ATP や GTP などのヌクレオシド三リン酸の細胞内濃度によっても確認できた (Fig. 4-1、Fig. 4-2)。また、メタボローム解析により L-メチオニン添加条件では細胞内 ATP の枯渇が明らかとなった (0.02 μmol g CDW^{-1}、Fig 4-1、黒色グラフ)。清酒酵母協会 6 号の L-メチオニン添加条件では、細胞内 AMP レベルの増加によってアデノシレートエネルギーチャージ (EC = ([ATP] + 0.5 × [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])) が減少していたことから、L-メチオニンが細胞内の同化代謝や生命維持反応活性を阻害することが示唆された (Guimaraes and Londesborough 2008)。これらの結果から、ATP 供給が L-メチオニン添加条件における SAM 生産の律速段階と考えられた (Fig. 4-1)。

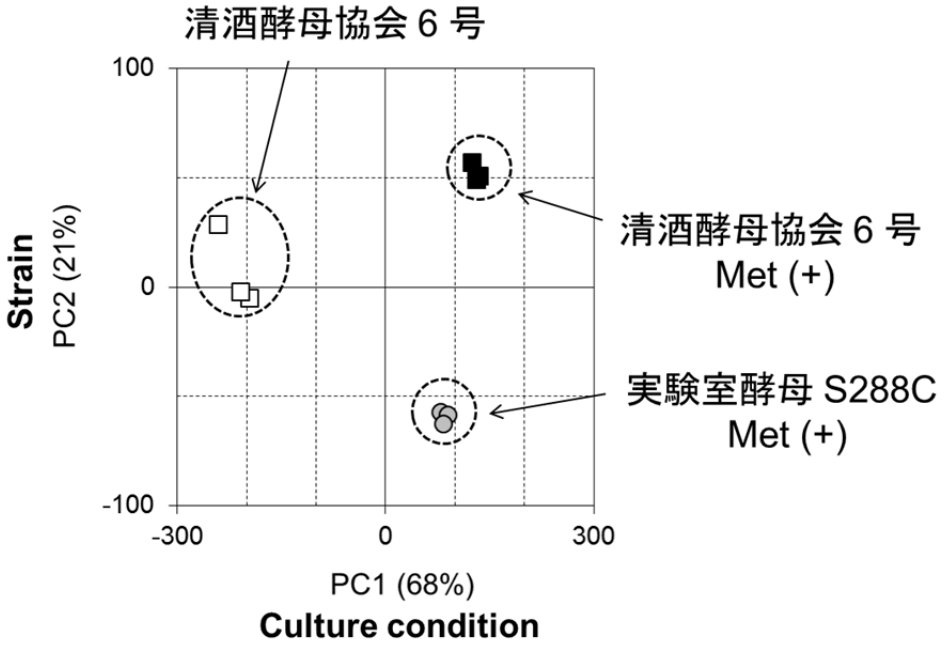
4. 4. 3. SAM 高生産株と実験室株の細胞内代謝物濃度の比較

L-メチオニン添加の有無にかかわらず、清酒酵母協会 6 号の SAM 生産量は、実験室酵母 S288C よりも高い値を示していた (Table 4-1)。前章で述べたように、^{13}C-MFA によって、高 TCA 回路フラックスに伴う ATP 再生能の向上が清酒酵母協会 6 号における SAM 生合成の活性化の要因となることを示した。清酒酵母は高呼吸活性を示し、一般的に好気条件では、実験室酵母と比較して TCA 回路、呼吸、酸化的リン酸化に関連する遺伝子の発現量が多いことも知られている (Kasahara 1963; Shobayashi et al. 2007b)。SAM 生産性に対する細胞内 ATP レベルの効果をさらに調査するため、比色分析により L-メチオニン無添加条件での清酒酵母協会 6 号と実験室酵母 S288C の細胞内 ATP 濃度を測定した。清酒酵母協会 6 号の結果は 4.5 ± 0.4 μmol g CDW^{-1} で、実験室酵母 S288C (1.5 ± 0.06 μmol g CDW^{-1}) の約 3 倍であったことから、清酒酵母協会 6 号の高 SAM 生産性は、高い細胞内 ATP 濃度によるものと確認できた。

しかしながら、前述したように L-メチオニン添加条件では清酒酵母協会 6 号の細胞内 ATP は枯渇していたため (Fig. 4-1)、清酒酵母協会 6 号の高 SAM 生産性に、高 ATP 含量は関与していないと考えられた。この課題に取り組むため、L-メチオニン添加条件における実験室酵母 S288C のメタボローム解析を行い、清酒酵母協会 6 号の結果と比較したが、大きな違いは見られなかった。そこで、SAM 生産性と関連して細胞内蓄積量が変化する代謝物を特定するため、ここまでに取得した 3 条件の全データに対して主成分分析 (PCA) を行った。PCA により、それぞれの条件で 3 回実施した培養実験から取得したメタボローム解析結果は、明確に区別できるクラスターを形成することを示した。第 1 主成分 (PC1) は L-メチオニン添加の有無を表し、第 2 主成分

(PC2) は細胞株の違いを表していると考えられた (Fig. 4-3a)。PC1 と PC2 に対する因子負荷量が両方とも 0.5 以上 である AMP、アデニン、アデノシン、コリン、γ-アミノ酪酸は、PC1 と PC2 スコアに正に寄与していた (Fig. 4-3b、Table S12)。この結果は、L-メチオニン添加条件における清酒酵母協会 6 号の AMP、アデニン、アデノシンの細胞内蓄積レベルは、実験室酵母 S288C よりも高い傾向にあることを示していた。これらの代謝物は、メチオニンサルベージ経路から供給される SAM 分解物のアデノシンヌクレオチドであることから、清酒酵母協会 6 号では L-メチオニン添加による SAM 供給量増加により当経路が活発に機能すると示唆された。

(a)



(b)

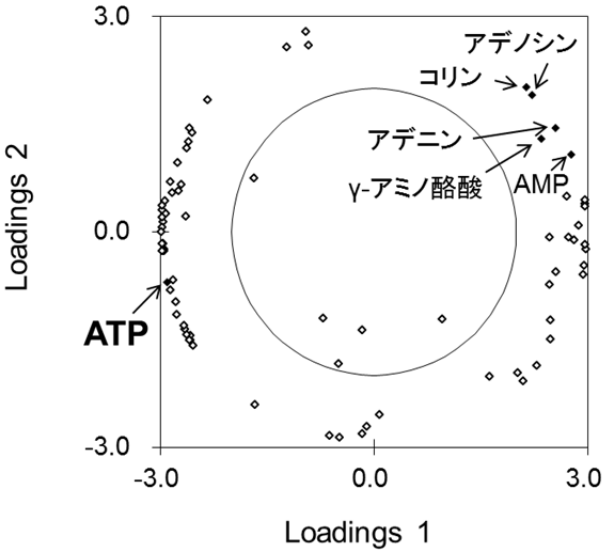


Fig. 4-3 主成分分析の主成分得点と負荷量

(a) PC1 と PC2 の主成分得点。白色四角は L-メチオニン無添加の清酒酵母協会 6 号、黒色四角と灰色丸は L-メチオニン添加の清酒酵母協会 6 号と実験室酵母 S288C を表している。(b) 各代謝物の PC1 と PC2 の主成分負荷量。数値データは Table S12 に示した。

4. 4. 4. SAM 生産に及ぼす細胞内 ATP 濃度の効果

メタボローム解析により、L-メチオニン添加条件では細胞内 ATP が枯渇することを示した。また、ATP 供給量を増加すると、SAM 生産量が向上する可能性を示唆していた。SAM 生産性向上には、ATP 生合成経路にかかわる遺伝子発現の増強や生産培地への ATP 添加によって達成できると考えられた。しかし、遺伝子組換え技術の適用や高価な原料の添加は、食品工業生産においては好ましくないため、培地成分組成の最適化による培養工学手法によって SAM 生産性向上を検討することにした。

酵母エキスは、自己消化した酵母の水溶性画分で、アミノ酸、ペプチド、炭水化物、ビタミン類、金属を含むため、出芽酵母の細胞増殖に重要な役割を果たす (Jiang et al. 2010; Mosser et al. 2015; Thomas et al. 2002)。細胞増殖を阻害し、細胞増殖に対する ATP 要求量を減少することで細胞内 ATP 蓄積量を増加させるため、様々な濃度 (0.0–5.0 g L^{-1}) の酵母エキスを含む培地で清酒酵母協会 6 号を培養した。その結果、酵母エキス濃度の減少に応じて、細胞増殖、エタノール生産量、pH が低下し、対照的に SAM 生産量と含量は、メタボローム解析データから示唆されたように増加した (Table 4-2)。酵母エキスを添加しない培地で SAM 生産量と含量の最大値 (315.6 mg L^{-1}、86.1 mg CDW^{-1}) が得られ、初期条件である 5.0 g L^{-1} (189.8 mg L^{-1}、33.6 mg CDW^{-1}) と比較して、それぞれ 1.6 倍と 2.5 倍増加した (Fig. 4-4a)。

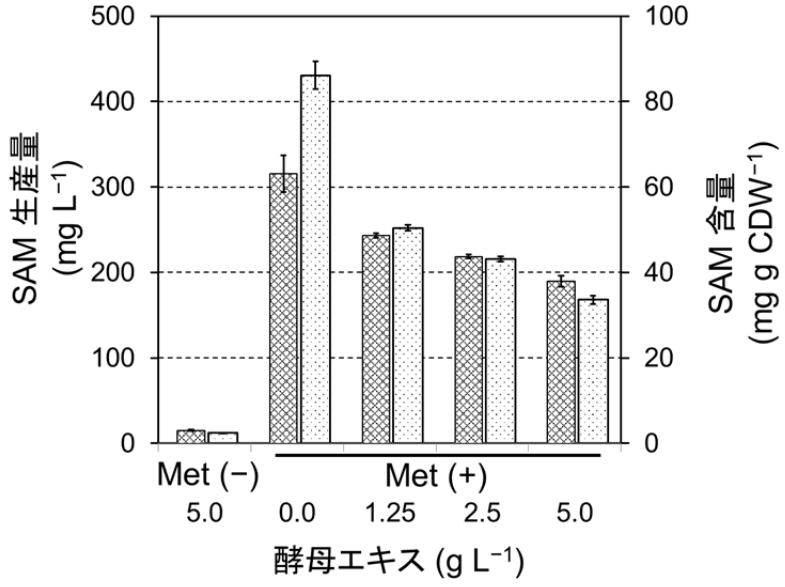
酵母エキス無添加培地における細胞内 ATP 濃度は 0.8 μmol g CDW^{-1} で、5.0 g L^{-1} 条件 (0.02 μmol g CDW^{-1}) の 40 倍に達していたことから、SAM 生産量は細胞内 ATP 濃度向上によって増加することも確認できた (Fig. 4-4b)。

Table 4-2 各酵母エキス濃度における培養実験結果

	酵母エキス (g L^{-1})			
	0.0	1.25	2.5	5.0
SAM 生産量 (mg L^{-1})	315.6 ± 21.4	243.0 ± 2.7	218.7 ± 2.1	189.8 ± 6.4
乾燥細胞重量濃度 (g CDW L^{-1})	3.7 ± 0.1	4.8 ± 0.03	5.1 ± 0.02	5.7 ± 0.03
SAM 含量 (mg g CDW^{-1})	86.1 ± 3.2	50.4 ± 0.7	43.2 ± 0.6	33.6 ± 0.9
エタノール生産量 (g L^{-1})	18.6 ± 0.1	19.0 ± 0.2	19.2 ± 0.4	19.3 ± 0.04
pH	4.6 ± 0.04	5.1 ± 0.1	5.2 ± 0.02	5.4 ± 0.01

数値は 3 回の培養実験の平均値と標準偏差を表している。

(a)



(b)

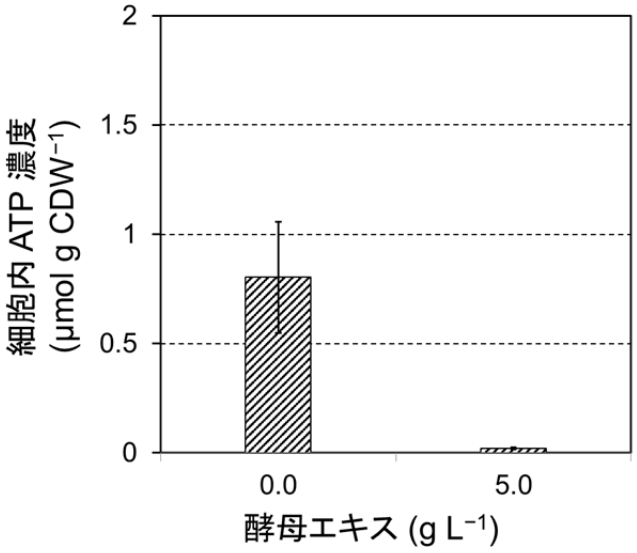


Fig. 4-4 SAM 生産量・含量、細胞内 ATP 濃度への酵母エキスの影響
(a) SAM 生産量・含量への酵母エキスの効果。網目と点付バーはそれぞれ、SAM 生産量と含量を表している。(b) 細胞内 ATP 濃度。エラーバーは標準偏差を表している。

4. 5. 考察

本章では、CE-TOFMS を使用したメタボローム解析により、さまざまな SAM 生産条件における出芽酵母の細胞内代謝物濃度を比較した。メタボローム解析によって、出芽酵母による SAM 生産のボトルネックは L-メチオニン供給 (Fig. 4-5a) であり、L-メチオニン存在下では ATP 供給が重要である (Fig. 4-5b) と示した。出芽酵母や *E. coli*、*Candida utilis* を宿主として、酸素供給量向上、遺伝子破壊や炭素源流加の最適化による細胞内 ATP レベルの向上により、SAM 生産量向上を達成した先行知見結果から、本章のメタボローム解析結果の妥当性を確認できた (Chen et al. 2015; Li et al. 2012; Wang et al. 2013)。*MET6* と *SAM2* の共発現とクエン酸ナトリウム流加を組み合わせた、L-メチオニンと ATP 利用効率向上による出芽酵母の SAM 含量増加も報告されている (Chen et al. 2016)。また、メタボローム解析結果から、L-メチオニン添加条件では、AMP などの SAM 分解物の細胞内蓄積レベルが増加することが分かった (Fig. 4-1、Fig. 4-3b)。これらの代謝物はメチオニンサルベージ回路で合成されるため、当代謝経路の活性低下によって、SAM 分解の抑制および SAM 生産量の向上が期待できる。

食品工業生産において遺伝子組換え技術の適用は好ましくないことから、本章では、培地組成の最適化による細胞内 ATP 濃度増加を検討した。培地に添加する酵母エキスを制限することで、細胞増殖阻害と、細胞内 ATP 濃度および SAM 生産量の向上を達成した (Fig. 4-5c)。SAM 含量 (86.1 mg g CDW^{-1}) は先行知見 (70 mg g CDW^{-1}) より高い値となった (Shobayashi et al. 2006)。一方で、SAM 生産量については、10 L 培養槽を使用した 5 日間の培養で 10.8 g L^{-1} に達した結果が報告されている (Shiozaki et al. 1986) ことから、細胞内 SAM 濃度と細胞量の向上により、培養液量あたりの SAM 生産性が増加すると示唆された。そのため、さらなる生産量向上には、富栄養培地での細胞増殖期と酵母エキスを制限した細胞増殖抑制期から成る 2 段階プロセスを取り入れたような培養プロセスの構築が必要と考えられる。本章で報告した取り組みにより、メタボローム解析は、培養工学的手法による有用物質の培養生産量増加検討に有益な情報を提供できることを示した。さらに、酵母エキス使用量の削減は、SAM 生産コストに対して効果的な方法であり、他のファインケミカル生産性向上検討においても役立つと考えられた。

出芽酵母の SAM 含量増加に対して、低撹拌速度やエタノール流加に起因する細胞増殖阻害が効果を有することは既に報告されているが (Shiozaki et al. 1989)、本章では、細胞増殖阻害に伴う細胞内 ATP レベルの向上による SAM 含量増加を明らかにした。また、酸ストレス条件下では出芽酵母の物質生産が阻害されることや、細胞内 ATP 蓄積は出芽酵母の酸ストレス耐性に関連していることが報告されている (Nugroho et al. 2015; Sakihama et al. 2015; Zhou et al. 2011)。また、ATP 供給が関与するグルタチオンやコハク酸などの有用物質のバイオ生産性の向上にも本章で検討した手法を活用できる

と考えられる (Hara and Kondo 2015)。これらの結果により、ATP 供給の向上は、出芽酵母の低 pH 条件への耐性を向上させ、間接的に SAM 生合成の活性化に寄与すると示唆された。このような出芽酵母の代謝と生理機能との関連のさらなる研究によって、より効率的な SAM 生産に向けた新たな方法論の確立が期待できる。

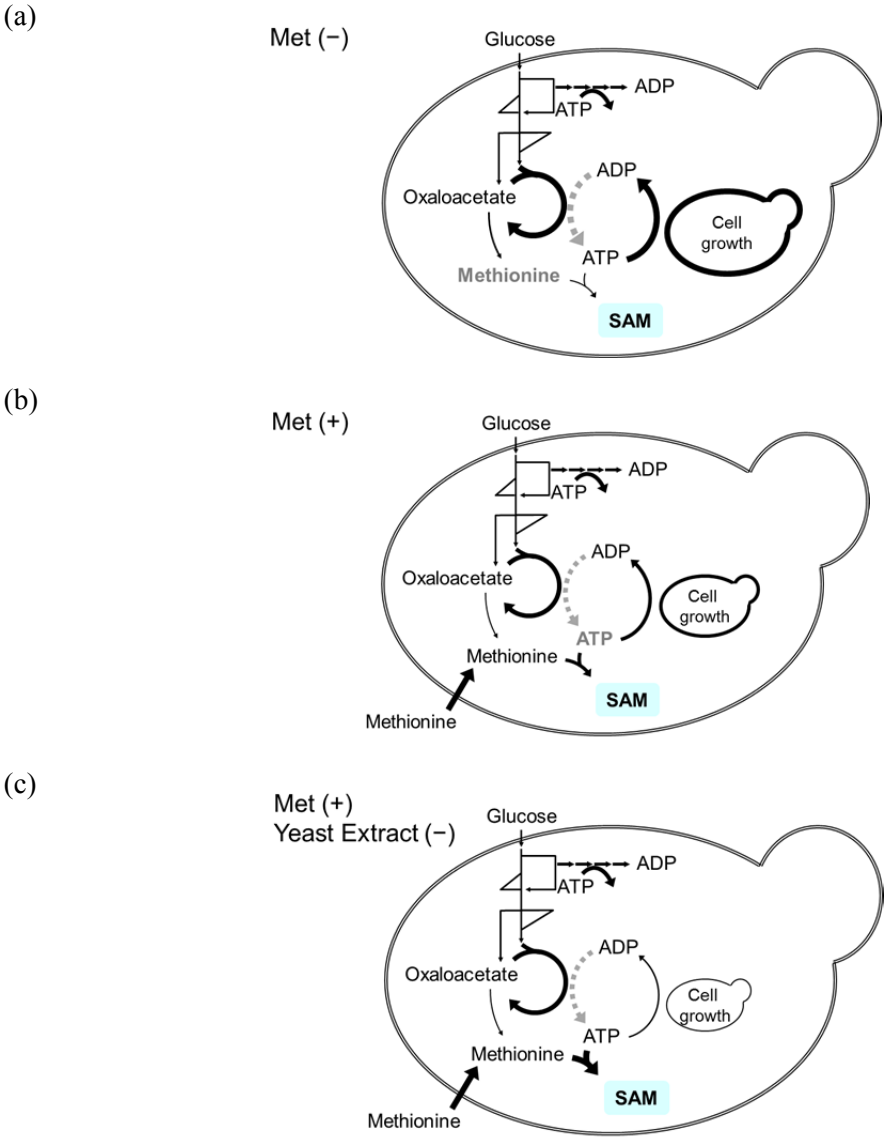


Fig. 4-5 SAM 高生産株の SAM 高生産機構

(a) L-メチオニン無添加、(b) L-メチオニン添加、(c) L-メチオニン添加・酵母エキス無添加。灰色点線矢印は呼吸鎖を表す。本章では、SAM 生産の律速段階として、L-メチオニン無添加条件は L-メチオニン供給、L-メチオニン添加条件は ATP 供給と示した (灰色字)。酵母エキス無添加条件における高生産は細胞増殖阻害に伴う ATP 供給の増加によって説明できた。

第 5 章　結論と展望

5. 1. 結果のまとめ

SAM は、生体内で様々なメチル化反応のメチル基供与体として機能する生理活性物質である。うつ病や関節炎などの治療薬やサプリメントとして利用されており、工業製品としても重要な物質である。今後の市場規模の拡大が予測されていることから (Fig. 1-2; P2011-177125A. 2011)、それに応えられる生産プロセスを構築する必要がある。その手段として、工業発酵生産の宿主として用いられている出芽酵母の細胞内代謝を改変し、生産性を向上することが期待されている。本研究では、代謝解析技術を用いて出芽酵母の SAM 高生産に関わる代謝経路を探索し、SAM 生産性向上および出芽酵母を用いた物質生産に向けた知見を抽出することを目的とした。そのため、^{13}C-MFA を用いて細胞内の代謝フラックス分布を推定することによって、(i) SAM 高生産株の高生産能力に関連する代謝経路、(ii) エタノール資化による SAM 含量増加に関連する代謝経路を探索し、メタボローム解析を用いて細胞内の代謝物濃度を測定することによって、(iii) SAM 生産の律速段階 (ボトルネック) を探索した。様々な培養条件における出芽酵母の代謝状態を ^{13}C-MFA とメタボローム解析を組み合わせて立体的に解析することによって、SAM 高生産に関わる代謝経路を明らかにした。さらに、解析結果を用いて、SAM 生産性向上に向けた戦略を提案した。

第 2 章では、^{13}C-MFA を用いて、実験室酵母 S288C 株と SAM 高生産株・清酒酵母協会 6 号の中央代謝系の代謝フラックス分布を推定し、中央代謝からの SAM 前駆体、NADPH と ATP 供給量を算出した。清酒酵母協会 6 号では、TCA 回路フラックスと酸化的リン酸化活性が高く、ATP 再生能が向上していた。酸化的リン酸化には酸素を必要とするため、清酒酵母協会 6 号の SAM 高生産能力は、高 TCA 回路フラックスと高呼吸活性による ATP 再生能向上が関連すると示唆された。SAM 生産性向上には、高 TCA 回路フラックスと高呼吸活性による ATP 供給量増加が重要であり、高呼吸活性を維持できる培養条件の設定あるいは呼吸活性が向上する遺伝子改変株の育種も有効な手段と考えられる。また、推定した代謝フラックス分布によって清酒酵母の特徴である高呼吸活性を説明できたことから、実用酵母においても ^{13}C-MFA を適用できると考えられる。それゆえ、^{13}C-MFA は高呼吸活性を指標とした新たな生産宿主のスクリーニング系としての活用が期待できる。

第 3 章では、^{13}C-MFA を用いて、清酒酵母協会 6 号のエタノール資化における中央代謝系の代謝フラックス分布を推定した。第 2 章で示したグルコースと異なり、エタノール資化では、グリオキシル酸経路が活性化し、ペントースリン酸経路には、ほとんど炭素が流れていないことが分かった。さらに、中央代謝からの NADPH と ATP 供給量を推算すると、エタノール資化ではグルコースより TCA 回路フラックスと酸化的

リン酸化活性が高く、多くの過剰な ATP を供給していた。それゆえ、エタノール資化による SAM 含量増加は、ATP 再生能向上が関連すると示唆された。SAM 生産性向上には、エタノール資化による ATP 供給量増加が重要と考えられた。また、エタノール資化は、グルコースと比較して CO_2 の炭素収率が高く、細胞が消費した炭素の 36–42% が TCA 回路から CO_2 として排出されていた。CO_2 生成量抑制には、TCA 回路を迂回するグリオキシル酸経路のフラックス増加が重要と示唆された。CO_2 生成の抑制によって、CO_2 収率低下と、それに伴う SAM 収率向上の可能性が考えられる。

第 4 章では、SAM 生産性が異なる培養条件の細胞内代謝物濃度の定量と多変量解析によるデータ解析を行い、細胞内で蓄積または欠乏している代謝物を抽出した。SAM 高生産株は対照株より細胞内 ATP 濃度が高く、L-メチオニンを用いた高生産条件では、ATP とその前駆体の細胞内濃度が低下していた。そこで、細胞増殖に使用される ATP 量を削減するため酵母エキス未含有培地で培養したところ、初期条件 (5.0 g L^{-1}) 培地と比較して細胞濃度が減少する一方、細胞内 ATP 濃度が増加し、SAM 生産量も 1.6 倍増加した。SAM 生産性向上には、L-メチオニン以外に ATP 供給量向上も関与し、増殖活性低下等の細胞内 ATP 消費の効率化が有効と考えられた。また、L-メチオニンを用いた条件ではメチオニンサルベージ経路中間体の細胞内濃度が増加していたことから、SAM 分解抑制には、当経路の代謝フラックスの低下が重要と示唆された。

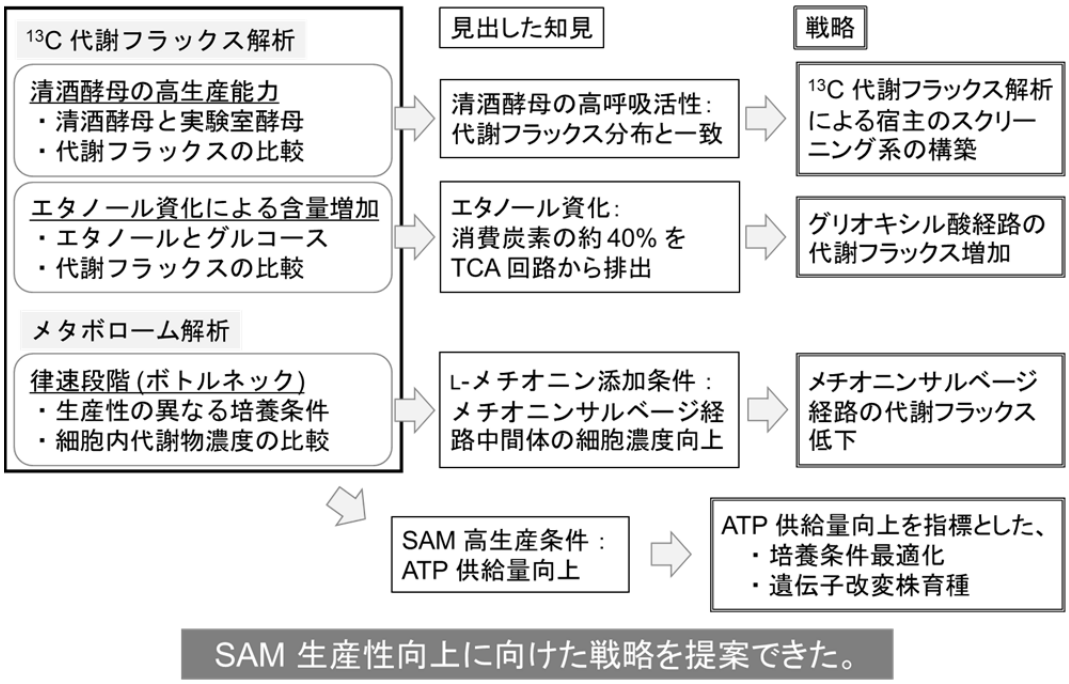


Fig. 5-1 本論文のまとめ

各章で見出した知見と SAM 生産性向上に向けた戦略を Fig. 5-1 に示した。第 4 章ではメタボローム解析結果から見出した知見をもとに培地組成の改良を行い、実際に SAM 生産量を増加させた。細胞内の代謝フラックスや代謝物濃度を把握する方法論の適用によって SAM 高生産に関連する代謝経路を探索することが SAM 生産量向上につながると示した。

本研究では、代謝状態を表す 2 つの指標 (代謝フラックスと細胞内代謝物濃度) から、SAM 高生産に関連する代謝経路を探索することで、ATP 再生能あるいは細胞内 ATP 濃度の向上によって ATP 供給量を高めることが SAM 生産に対して重要であると示した。SAM 生産では、ATP は反応進行のためのエネルギー供給と、前駆体という 2 つの役割を持っている (Fig. 5-2)。第 2、3 章では、^{13}C-MFA を用いて清酒酵母協会 6 号の高生産能力とエタノール資化による含量増加は ATP 再生能の向上が関与していると明らかにした。これは、ADP から ATP を再生する反応速度が向上することで、エネルギーとしての ATP 供給速度が向上していることを表している。1 分子の SAM の合成には、エネルギーとして 13 分子の ATP を必要とする。そのため、ATP 再生速度が向上すると L-メチオニンおよび ATP 合成反応速度も向上し、SAM 生産性向上に寄与すると考えられた。第 4 章のメタボローム解析では、L-メチオニンを用いた高生産条件において、細胞内で ATP が枯渇していることを明らかにし、細胞増殖抑制による ATP 供給量増加によって SAM 生産性を向上させた。これらの結果から、当条件では前駆体としての ATP 供給がボトルネックであったと推定できる。このように、2 つの指標を定量的に評価できる解析技術を組み合わせると、SAM 高生産には、SAM 生産に対する ATP の両方の役割における供給量の増加が重要と示すことができる。

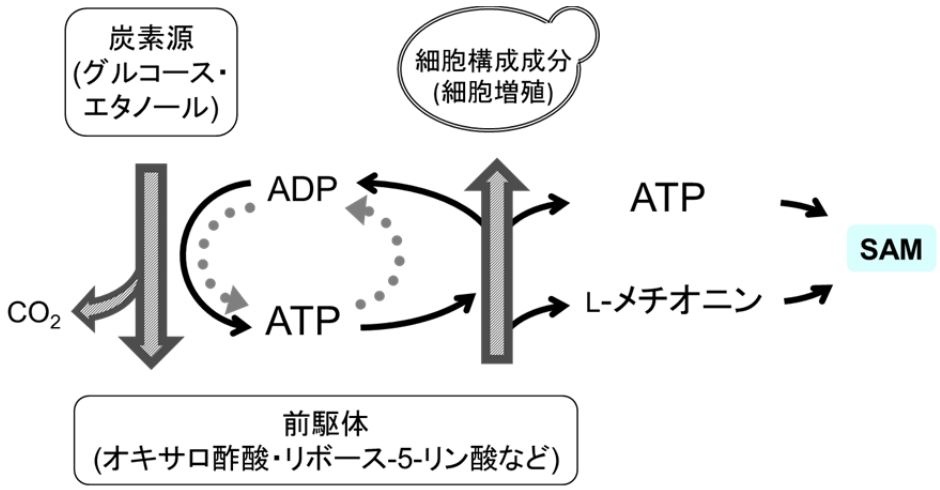


Fig. 5-2 SAM 生産における ATP の役割
灰色丸点線矢印は、エネルギー供給としての消費と再生を表している。黒矢印は細胞構成成分 (RNA) あるいは SAM 前駆体としての変換を表している。

第 3 章では、清酒酵母協会 6 号におけるエタノール資化の代謝フラックス分布を推定した。これまでに、^{13}C-MFA を用いてエタノール資化の代謝フラックス分布を推定した報告は無く、また、清酒酵母の代謝フラックス解析結果も少ないため、細胞生理学的な解析にもよく用いられている実験室酵母を比較対照とする必要がある (Agrimi et al. 2014)。そこで、まず第 2 章で、実験室酵母 S288C と清酒酵母協会 6 号におけるグルコース資化の代謝フラックス分布を推定した。実験室酵母 S288C の結果は先行知見と合致しており (Frick and Wittmann 2005; Gombert et al. 2001; Wang and Hatzimanikatis 2006)、清酒酵母協会 6 号では、その高呼吸活性の特徴を説明できる結果となった。それゆえ、本研究で用いた ^{13}C-MFA の手法は清酒酵母に適用が可能であると判断した。次に、グルコース資化の結果や遺伝子あるいはタンパク質レベルで解析した先行知見と比較することで、推定したエタノール資化における代謝フラックス分布結果の妥当性を示すことができた。

本研究の第 2、3 章における ^{13}C-MFA で設定した酵母の代謝モデルを構成する中央代謝系や SAM 生合成路は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* という生物の分類レベルで種のレベルまで完全に同じものであり、実験室酵母も含めて各株で共通だと考えられる (Akao et al. 2011; Shobayashi et al 2007b)。本研究では、SAM は人間が経口摂取するための用途であることも考え、安全性も高く大規模生産も可能である出芽酵母を研究材料とした。その中でも清酒酵母は SAM 生産量が高い知見もあり、研究対象として、より生産量の高いものを初期の段階で選抜した。一方で、生産性向上のしやすさという観点からの生産株の選択は非常に重要で、その点からも細胞株の解析を行った。各章を通じて、SAM 生産に対する ATP 再生能の高さと供給の重要性が示されており、清酒協会酵母 6 号は高い ATP 供給能力を備えた株であったことが明らかになっている。そのため、清酒酵母協会 6 号は、元来の改良のポテンシャルも高かったと考えられる。さらに、出芽酵母が本来生産しない有用物質の物質生産において、ATP 供給能力の高い出芽酵母株を宿主として選択することによって、生産性向上に対する改良の効果が大きくなる可能性を期待できる。また、Fig. 2-4、4-1 と Table 4-1 の結果から、実験室酵母 S288C と清酒酵母協会 6 号と同様に、他の清酒酵母においても、L-メチオニン添加によって L-メチオニン枯渇によるボトルネックが解消され、ATP 供給がボトルネックとなると予測された。それゆえ、第 4 章で見出した、培地成分制限によって細胞内 ATP 濃度を増加させ、SAM 生産性を向上する手段は、他の SAM 高生産能力を有する清酒酵母においても適用できると考えられる。

本研究結果から得られた、他の有用物質生産への活用に向けた知見について述べる。出芽酵母を用いたアミノ酸やタンパク質生産では、アンモニウムイオンの取り込みに必要な ATP を減らすことによって生産性が向上した結果が報告されている (Milne et al. 2015)。また、アンモニウムイオンの取り込みや生合成反応で ATP を消費するグルタチオンも ATP 供給が重要と考えられている (Hara et al. 2012)。このような代謝物生産で

は、本研究で示した ATP 供給量を高める手段である、ATP 供給能力の高い生産出芽酵母の選択、エタノールを原料とする生産、培地成分制限による細胞増殖阻害が有効と期待できる。第 2 章の清酒酵母協会 6 号と実験室酵母 S288C 株の代謝フラックス分布を比較した結果から、清酒酵母協会 6 号の方が TCA 回路のフラックスレベルが高いことが明らかとなった (Fig. 2-6)。この代謝経路の中間体としてアミノ酸ロイシン前駆体のミトコンドリア・アセチル-CoA やコハク酸、リンゴ酸があり、清酒酵母協会 6 号のように TCA 回路の代謝フラックスレベルが高い株がこれらの代謝物生産の宿主として適していると考えられる。また、物質生産能力に関与する前駆体、ATP と NADPH 供給速度やそれぞれの細胞内でのバランスを比較することで (Fig. 2-6、2-7a、2-7b)、目的物質生産に最も寄与する因子に着目した高生産能力株の取得手段の提案が可能となる。ATP が最も寄与する場合は、第 2 章で示したように、TCA 回路代謝フラックスや呼吸活性の向上が重要であり、NADPH の場合では、ペントースリン酸経路あるいはリンゴ酸経路の代謝フラックスを向上させる戦略が有効と考えられる。第 3 章では、エタノール資化における代謝フラックス分布を推定した。エタノール資化によって細胞質アセチル-CoA を供給できることから、細胞質アセチル-CoA を前駆体とするファルネセン、脂肪酸エステル、カロテノイド (Verwaal et al. 2007) 生産では、エタノールを原料とすることが生産性向上に寄与すると考えられる。一方で、CO_2 収率も上昇し (Table 3-3)、CO_2 の多くは TCA 回路から生成する (Table 3-5) と予測できるため、上記で述べたように TCA 回路を迂回する代謝経路のフラックス増加が CO_2 生成量抑制に役立つと期待できる。第 4 章では、高生産条件において細胞内濃度が高い代謝物を基質とする代謝反応を探索することでボトルネックを抽出し、その解消に向けた手段を提案できた。また、目的物質の分解経路中間体の濃度を解析することによって、その経路の反応活性を抑制することが有効かの判断が可能となると考えられた。

以上の研究結果から、^{13}C-MFA やメタボローム解析を用いた細胞内の代謝フラックスや代謝物濃度の定量は、物質生産に関連する代謝経路の探索と高生産に向けた戦略の提案に有効な方法と考えられた。続いて、SAM 生産性向上に向けた戦略や出芽酵母を用いた、その他の有用物質生産性向上に代謝解析を活用する方法論に対する、本研究がもたらす寄与と今後の展望を述べる。

5. 2. 本研究の寄与

微生物を用いた物質生産において、コスト競争力のある生産プロセスを構築するためには、生産株の改良あるいは培養条件の最適化により、生産性向上に取り組むことが必要となる。一方で、目的の生産性に効率よく達するためには、生産株細胞内の物質生産過程 (代謝) を解析し、新たな戦略を立案していくことも重要と考えられる。本研究では、^{13}C-MFA やメタボローム解析技術を用いて、出芽酵母の SAM 高生産に関連する代謝経路を探索した。

第 2 章では、^{13}C-MFA を用いて、SAM 生産能力が異なる 2 種類の出芽酵母 (清酒酵母協会 6 号と実験室酵母 S288C) の代謝フラックス分布と細胞内の酸化還元バランスやエネルギー状態を比較し、SAM 生産能力に ATP 再生能が関連すると推定した。また、清酒酵母協会 6 号は日本酒醸造で使われる実用酵母であり、^{13}C-MFA によって、実用酵母と実験室酵母の代謝フラックスレベルでの違いを明らかにした。清酒酵母協会 6 号は高い呼吸活性を有することが知られており (Kasahara 1963; Shobayashi et al. 2007b)、推定した代謝フラックス分布からもこの特徴を確認できた。^{13}C-MFA を用いることで、パン製造等の様々な用途で使用されている実用酵母の特徴を把握あるいは比較できる可能性が考えられる。

第 3 章では、SAM 含量向上効果を有する炭素源であるエタノール資化における代謝フラックス分布を推定した。本研究が初めて、^{13}C-MFA を用いてエタノール資化での代謝フラックス分布を推定し、グルコース資化における代謝フラックス分布との差異の把握が可能であると示した。また、エタノールを資化することによって、グルコースよりも ATP 再生能が高くなることから、エタノールによる SAM 含量増加にも ATP 供給量向上が関連すると推定した。一方で、エタノール資化はグルコースと比較して CO_2 収率が高く、代謝フラックス分布結果より、特に TCA 回路から生成する比率が大きいことが分かった。この結果から、TCA 回路を迂回する代謝経路のフラックス増加による CO_2 生成の抑制によって炭素利用効率を向上する戦略を見出した。さらに、この知見は CO_2 生成が生産収率低下の原因となっている SAM 以外の有用物質生産においても活用が期待できる。

ここまでの研究結果で、SAM 生産性の異なる条件における細胞内の代謝フラックス分布の推定および比較は、SAM 生産に関連する代謝経路の探索に有効と示した。しかし、^{13}C-MFA は細胞内に取り込まれる全ての炭素原子の代謝を考慮する必要があるため、培地に含まれる炭素源の種類が増えると、細胞内代謝物の ^{13}C 濃縮度からの代謝フラックス推定は困難となる課題がある。そのため、天然物由来のエキス等を用いる天然培地や半合成培地のような成分組成の複雑な培地で ^{13}C-MFA を適用することは難しくなる。そこで第 4 章では、実用生産でも用いられる半合成培地で SAM 生産のボトルネックを特定するため、メタボローム解析を用いて代謝物の細胞内濃度を測定した。

培養容器から取得した試料には培養液上清由来の成分が含まれているが、本研究では細胞と培養液上清の分離と細胞の洗浄を迅速に行い、様々な SAM 生産条件の細胞内の代謝物濃度の差を正確に把握することで、L-メチオニンを用いた SAM 高生産条件における細胞内 ATP の枯渇を見出すことができた。当手法を用いて培地成分の影響を除外することにより、多数の炭素源を含む培地を用いた培養生産においても細胞内代謝物濃度を評価できると考えられる。さらに、培地への酵母エキス添加量を制限することで、細胞増殖阻害による ATP 消費量の減少とそれに伴う細胞内 ATP 濃度の向上によって SAM 生産量を増加させた。また、リン酸塩等の他の培地成分は ATP 生合成反応の促進に寄与すると考えられることから、これらの成分の制限効果の検証は不要と判断できたため、検討のスピードアップにも寄与した。酵母エキス使用量の減少は培地コストを引き下げるため、生産コスト削減に対しても効果的である。また、食品工業生産においても有効な手法であり、実用生産で貢献可能な知見と考えられる。生産性に ATP 消費の効率化が関与する有用物質生産での活用も期待できる (Hara and Kondo 2015; de Kok et al. 2012)。

本研究で提案した戦略は、実用研究で用いられている高生産条件 (P4479932. 2010; WO2010/027014 A1. 2010) の解析によって SAM 生産への関連が明らかとなった代謝経路の活性を変化させるものである。そのため、これらの戦略を実用研究での生産系に適用することで、相乗効果によって生産性が向上すると期待できる。

このように、本研究では、^{13}C-MFA やメタボローム解析は、SAM 高生産に関連する代謝経路を明らかにするとともに、生産性向上を目指した今後の展開に役立つことを示した。また、実用生産で利用している細胞株、炭素源と培地組成を解析対象としたことから、実用生産プロセスの改善にも活用できると考えられる。代謝は細胞内の物質生産過程そのものであり、第 1 章 (1.1 節) で述べた、その他の有用物質生産系においても、ターゲットとする代謝経路は異なるが、本研究の手法や知見を活用できる可能性が高い。本研究で用いた代謝解析の方法論は実用生産を含めた他の有用物質生産でも有効と期待できる。

5. 3. 今後の展望

本研究では、^{13}C-MFA やメタボローム解析を用いて見出した SAM 高生産に関連する代謝経路に基づいた SAM 生産性向上への戦略を提案した。次の展開として、遺伝子改変あるいは培養工学的手法を用いた代謝改変による実証研究が必要となる。SAM 高生産には ATP 供給量向上の関連が示唆されたことから、培養中の高呼吸活性維持が重要となる。生産株の遺伝子改変による呼吸系酵素発現量向上やミトコンドリア活性向上 (分裂促進・呼吸阻害耐性向上)、あるいは炭素源の種類・供給方法、培地組成 (呼吸活性関連因子の添加) や溶存酸素濃度などの培養条件検討が有効と考えられる。富栄養培地での細胞増殖期と酵母エキスを制限した細胞増殖抑制期から成る 2 段階の培養プロセスの構築も生産性向上に寄与するだろう。また、メチオニンサルベージ経路のフラックス低下やグリオキシル酸経路のフラックス増加によっても、SAM 生産の効率化を期待できる。さらに、第 1 章 (1. 2 節) 等で述べた SAM 生産性向上についての先行研究結果と本研究の代謝解析から得られた知見を組み合わせることも実証研究に活用できると考えている。

高度化した代謝解析技術の適用も、新たな戦略の提案に重要である。^{13}C-MFA を用いて細胞内代謝フラックス分布を推定すると、異なる細胞株や培養条件における代謝状態の変化を定量的に評価できる。本研究では、解析対象株の細胞構成成分組成を一定として細胞合成フラックスを導出したが、Long らが提案した GC-MS による細胞構成成分の測定法を用いることで、より正確な炭素収支を表す細胞合成フラックスを決定できる (Long and Antoniewicz, 2014)。複数の ^{13}C 標識炭素源条件の培養実験から得られる ^{13}C 濃縮度や GC-MS/MS 分析による ^{13}C 標識の位置情報を含む ^{13}C 濃縮度を使用することで、導出した代謝フラックスの信頼区間を狭くできる可能性がある (Crown et al. 2016; Okahashi et al. 2016)。これらの手法を用いることで、さらに精度の高い代謝フラックス分布を推定できるだろう。本研究では連続培養系における代謝フラックス分布を推定したが、実用生産で用いられる流加培養系の解析も必要となる。代謝状態が定常ではない流加培養における代謝フラックス分布を算出できる最適化計算技術の開発が望まれる。

本研究のメタボローム解析では、有機酸等の極性代謝物の分離と精密質量の検出のため、CE-TOFMS を分析装置として用いた。遺伝子改変した出芽酵母の評価を目的としたメタボローム解析に GC-MS や LC-MS/MS が用いられており (Nishino et al. 2015; Teoh et al. 2015)、これらの装置も用いて本研究で測定対象としなかった代謝物を定量することで新規の知見を見出せると考えられる。例えば、L-メチオニン生合成経路中間体の細胞内濃度の定量とボトルネックの特定から L-メチオニン合成フラックスを向上できれば、L-メチオニンを使用しない培養生産方法によって SAM 生産コストの大幅な削減が期待できる。同様に、ATP 合成フラックス向上による ATP 供給量向上も SAM 高

生産への効果的な手段となるだろう。

また、*in silico* シミュレーションによる SAM 生産性向上に向けた代謝改変戦略の導出も期待できる。FBA、^{13}C-MFA やメタボロームあるいはプロテオーム等の ‘omics’ 解析の結果を組み合わせたダイナミックシミュレーションの活用が考えられる。一連の代謝シミュレーションを用いた、SAM 高生産が可能な代謝状態の推定と代謝改変ターゲットの効率的な探索によって、育種戦略の革新に貢献できると考えている (Asadollahi et al. 2009; Brunk et al. 2016; Khodayari et al. 2014; Matsuda et al. 2015)。

最近では、特異的なゲノムの破壊や置換が可能な遺伝子改変技術である「ゲノム編集 (Genome Editing)」が、出芽酵母においても機能すると報告されており (DiCarlo et al. 2013; Nishida et al 2016)、高生産株の育種を加速させる強力なツールとなると期待されている。物質生産性を高める代謝改変ターゲットの提案はさらに重要となるだろう。

本論文で示した知見によって、生産株細胞内の代謝フラックスや代謝物濃度を定量できる代謝解析技術は、出芽酵母を用いた有用物質生産プロセス開発における基盤技術として貢献できると期待している。

参考文献

Agrimi G, Mena MC, Izumi K, Pisano I, Germinario L, Fukuzaki H, Palmieri L, Blank LM, Kitagaki H (2014) Improved sake metabolic profile during fermentation due to increased mitochondrial pyruvate dissimilation. FEMS Yeast Res 14(2):249–60

Akada R (2002) Genetically modified industrial yeast ready for application. J Biosci Bioeng 94:536–44

Akao T, Yashiro I, Hosoyama A, Kitagaki H, Horikawa H, Watanabe D, Akada R, Ando Y, Harashima S, Inoue T, Inoue Y, Kajiwara S, Kitamoto K, Kitamoto N, Kobayashi O, Kuhara S, Masubuchi T, Mizoguchi H, Nakao Y, Nakazato A, Namise M, Oba T, Ogata T, Ohta A, Sato M, Shibasaki S, Takatsume Y, Tanimoto S, Tsuboi H, Nishimura A, Yoda K, Ishikawa T, Iwashita K, Fujita N, Shimoi H (2011) Whole-genome sequencing of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no. 7. DNA Res 18(6):423−34

Ando A, Tanaka F, Murata Y, Takagi H, Shima J (2006) Identiication and classification of genes required for tolerance to high-sucrose stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res 6:249–67

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

Antoniewicz MR, Kraynie DF, Laffend LA, González-Lergier J, Kelleher JK, Stephanopoulos G (2007) Metabolic flux analysis in a nonstationary system: fed-batch fermentation of a high yielding strain of *E. coli* producing 1,3-propanediol. Metab Eng 9(3):277–92

Asadollahi MA, Maury J, Patil KR, Schalk M, Clark A, Nielsen J (2009) Enhancing sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* through *in silico* driven metabolic engineering. Metab Eng 11(6):328−34

Bartek T, Blombach B, Lang S, Eikmanns BJ, Wiechert W, Oldiges M, Nöh K, Noack S (2011) Comparative ^{13}C metabolic flux analysis of pyruvate dehydrogenase complex-deficient, L-valine-producing *Corynebacterium glutamicum*. Appl Environ Microbiol. 77(18):6644−52

Bergdahl B, Heer D, Sauer U, Hahn-Hägerdal B, van Niel EW (2012) Dynamic metabolomics differentiates between carbon and energy starvation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* fermenting xylose. Biotechnol Biofuels 5(1):34

Boles E, de Jong-Gubbels P, Pronk JT (1998) Identification and characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. J Bacteriol 180(11):2875–82

Borodina I, Nielsen J (2014) Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. Biotechnol J 9(5):609–20

Bradley JD, Flusser D, Katz BP, Schumacher HR Jr, Brandt KD, Chambers MA, Zonay LJ (1994) A randomized, double blind, placebo controlled trial of intravenous loading with *S*-adenosylmethionine (SAM) followed by oral SAM therapy in patients with knee osteoarthritis. J Rheumatol 21(5):905−11

Breker M, Gymrek M, Schuldiner M (2013) A novel single-cell screening platform reveals proteome plasticity during yeast stress responses. J Cell Biol 200(6):839–50

Brochado AR, Matos C, Møller BL, Hansen J, Mortensen UH, Patil KR (2010) Improved vanillin production in baker's yeast through *in silico* design. Microb Cell Fact 9:84

Brown S, Clastre M, Courdavault V, O'Connor SE (2015) De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 112:3205–10

Brunk E, George KW, Alonso-Gutierrez J, Thompson M, Baidoo E, Wang G, Petzold CJ, McCloskey D, Monk J, Yang L, O'Brien EJ, Batth TS, Martin HG, Feist A, Adams PD, Keasling JD, Palsson BO, Lee TS (2016) Characterizing Strain Variation in Engineered *E. coli* Using a Multi-Omics-Based Workflow. Cell Syst 2(5):335−46

Carlquist M, Gibson B, Karagul Yuceer Y, Paraskevopoulou A, Sandell M, Angelov AI, Gotcheva V, Angelov AD, Etschmann M, de Billerbeck GM, Lidén G (2015) Process engineering for bioflavour production with metabolically active yeasts - a mini-review. Yeast 32(1):123–43

Caspeta L, Castillo T, Nielsen J (2015) Modifying Yeast Tolerance to Inhibitory Conditions of Ethanol Production Processes. Front Bioeng Biotechnol 3:184

Chen H, Wang Z, Wang Z, Dou J, Zhou C (2016) Improving methionine and ATP availability by *MET6* and *SAM2* co-expression combined with sodium citrate feeding enhanced SAM accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. World J Microbiol Biotechnol 32(4):56

Chen Y, Lou S, Fan L, Zhang X, Tan T (2015) Control of ATP concentration in *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs for enhanced *S*-adenosylmethionine production. FEMS Microbiol Lett 362:fnv115

Chen Y, Siewers V, Nielsen J (2012) Profiling of cytosolic and peroxisomal acetyl-CoA metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS One 7(8):e42475

Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP (1996) *S*-Adenosylmethionine and methylation. FASEB J 10(4):471−80

Chu J, Qian J, Zhuang Y, Zhang S, Li Y (2013) Progress in the research of *S*-adenosyl-L-methionine production. Appl Microbiol Biotechnol 97(1):41−9

Crown SB, Long CP, Antoniewicz MR (2016) Optimal tracers for parallel labeling experiments and ^{13}C metabolic flux analysis: A new precision and synergy scoring system. Metab Eng 38:10−18

Daran-Lapujade P, Jansen ML, Daran JM, van Gulik W, de Winde JH, Pronk JT (2004) Role of

transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. J Biol Chem 5;279(10):9125–38

DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM (2013) Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Res 41(7):4336−43

Fletcher E, Krivoruchko A, Nielsen J (2016) Industrial systems biology and its impact on synthetic biology of yeast cell factories. Biotechnol Bioeng 113(6):1164–70

Förster J, Famili I, Fu P, Palsson BØ, Nielsen J (2003) Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. Genome Res 13(2):244–253

Frick O, Wittmann C (2005) Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ^{13}C flux analysis. Microb Cell Fact 4:30

Galanie S, Thodey K, Trenchard IJ, Filsinger Interrante M, Smolke CD (2015) Complete biosynthesis of opioids in yeast. Science 349:1095–100

Gombert AK, Moreira dos Santos M, Christensen B, Nielsen J (2001) Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. J Bacteriol 183(4):1441–51

Guimaraes PM, Londesborough J (2008) The adenylate energy charge and specific fermentation rate of brewer's yeasts fermenting high- and very high-gravity worts. Yeast 25:47–58

Hara KY, Kiriyama K, Inagaki A, Nakayama H, Kondo A (2012) Improvement of glutathione production by metabolic engineering the sulfate assimilation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 94(5):1313−9

Hara KY, Kondo A (2015) ATP regulation in bioproduction. Microb Cell Fact 14:198

Hasunuma T, Kondo A (2012) Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. Biotechnol Adv 30(6):1207–18

Hasunuma T, Sanda T, Yamada R, Yoshimura K, Ishii J, Kondo A (2011) Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Microb Cell Fact 10:2

Hayakawa K, Kajihata S, Matsuda F, Shimizu H (2015) ^{13}C-metabolic flux analysis in *S*-adenosyl-L-methionine production by *Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci Bioeng 120:532–8

He J, Deng J, Zheng Y, Gu J (2006) A synergistic effect on the production of *S*-adenosyl-L-methionine in *Pichia pastoris* by knocking in of *S*-adenosyl-L-methionine synthase and knocking out of cystathionine-beta synthase. J Biotechnol 126:519–27

Hu XQ, Chu J, Zhang SL, Zhuang YP, Wang YH, Zhu S, Zhu ZG, Yuan ZY (2007) A novel feeding strategy during the production phase for enhancing the enzymatic synthesis of

S-adenosyl-L-methionine bymethylotrophic *Pichia pastoris*. EnzymMicrob Technol 40(4):669–74

Hu XQ, Chu J, Zhang Z, Zhang SL, Zhuang YP, Wang YH, Guo MJ, Chen HX, Yuan ZY (2008) Effects of different glycerol feeding strategies on *S*-adenosyl-L-methionine biosynthesis by P_{GAP}-driven *Pichia pastoris* overexpressing methionine adenosyltransferase. J Biotechnol 137(1-4):44–9

Huang Y, Gou X, Hu H, Xu Q, Lu Y, Cheng J (2012) Enhanced *S*-adenosyl-L-methionine production in *Saccharomyces cerevisiae* by spaceflight culture, overexpressing methionine adenosyltransferase and optimizing cultivation. J Appl Microbiol 112(4):683−94

Jiang M, Chen K, Liu Z, Wei P, Ying H, Chang H (2010) Succinic acid production by Actinobacillus succinogenes using spent brewer's yeast hydrolysate as a nitrogen source. Appl Biochem Biotechnol 160:244–54

Johnson ET, Schmidt-Dannert C (2008) Light-energy conversion in engineered microorganisms. Trends Biotechnol 26(12):682−9

de Jong BW, Shi S, Siewers V, Nielsen J (2014) Improved production of fatty acid ethyl esters in *Saccharomyces cerevisiae* through up-regulation of the ethanol degradation pathway and expression of the heterologous phosphoketolase pathway. Microb Cell Fact 13(1):39

de Jong-Gubbels P, Vanrolleghem P, Heijnen S, van Dijken JP, Pronk JT (1995) Regulation of carbon metabolism in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* grown on mixtures of glucose and ethanol. Yeast 11(5):407–18

Jouhten P, Rintala E, Huuskonen A, Tamminen A, Toivari M, Wiebe M, Ruohonen L, Penttilä M, Maaheimo H (2008) Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A. BMC Syst Biol 2:60

Juminaga D, Baidoo EE, Redding-Johanson AM, Batth TS, Burd H, Mukhopadhyay A, Petzold CJ, Keasling JD (2012) Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 78(1):89−98

Kajihata S, Furusawa C, Matsuda F, Shimizu H (2014) OpenMebius: An open source software for isotopically nonstationary ^{13}C-based metabolic flux analysis. BioMed Research International 2014 627014

Kanai M, Masuda M, Takaoka Y, Ikeda H, Masaki K, Fujii T, Iefuji H (2013) Adenosine kinase-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* accumulates *S*-adenosylmethionine because of an enhanced methionine biosynthesis pathway. Appl Microbiol Biotechnol 97:1183–90

Kasahara H. Kyokai yeast (1963) J Brew Soc Jpn 58:583-6

Kildegaard KR, Jensen NB, Schneider K, Czarnotta E, Özdemir E, Klein T, Maury J, Ebert BE, Christensen HB, Chen Y, Kim IK, Herrgård MJ, Blank LM, Forster J, Nielsen J, Borodina I

(2016) Engineering and systems-level analysis of *Saccharomyces cerevisiae* for production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA reductase-dependent pathway. Microb Cell Fact 15:53

Kitagaki H (2014) Variations in mitochondrial membrane potential correlate with malic acid production by natural isolates of *Saccharomyces cerevisiae* sake strains. FEMS Yeast Res 14(5):789–96

Khodayari A, Zomorrodi AR, Liao JC, Maranas CD (2014) A kinetic model of *Escherichia coli* core metabolism satisfying multiple sets of mutant flux data. Metab Eng 25:50−62

Kogure T, Kubota T, Suda M, Hiraga K, Inui M (2016) Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for shikimate overproduction by growth-arrested cell reaction. Metab Eng 38:204−16

de Kok S, Kozak BU, Pronk JT, van Maris AJ (2012) Energy coupling in *Saccharomyces cerevisiae*: selected opportunities for metabolic engineering. FEMS Yeast Res 12(4):387–97

Kotaka A, Sahara H, Hata Y, Abe Y, Kondo A, Kato-Murai M, Kuroda K, Ueda M (2008) Efficient and direct fermentation of starch to ethanol by sake yeast strains displaying fungal glucoamylases. Biosci Biotechnol Biochem 72(5):1376–9

Kozak BU, van Rossum HM, Niemeijer MS, van Dijk M, Benjamin K, Wu L, Daran JM, Pronk JT, van Maris AJ (2016) Replacement of the initial steps of ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* by ATP-independent acetylating acetaldehyde dehydrogenase. FEMS Yeast Res 16(2):fow006

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

Li M, Meng X, Diao E, Du F, Zhao X (2012) Productivity enhancement of *S*-adenosylmethionine in *Saccharomyces cerevisiae* using *n*-hexadecane as oxygen vector. J Chem Technol Biotechnol 87:1379–84

Lieber CS (2002) *S*-adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders. .Am J Clin Nutr 76(5):1183S−7S

Long CP, Antoniewicz MR (2014) Quantifying biomass composition by gas chromatography/mass spectrometry. Anal Chem 86(19):9423−7

Maeda K, Okahashi N, Toya Y, Matsuda F, Shimizu H (2016) Investigation of useful carbon tracers for ^{13}C-metabolic flux analysis of *Escherichia coli* by considering five experimentally determined flux distributions. Metabolic Engineering Communications 3:187–95

Markham GD, Hafner EW, Tabor CW, Tabor H (1980) *S*-Adenosylmethionine synthetase from

Escherichia coli. J Biol Chem 255(19):9082−92

Matos JR, Raushel FM, Wong CH (1987) *S*-adenosylmethionine: studies on chemical and enzymatic synthesis. Biotechnol Appl Biochem 9(1):39−52

Matsuda F, Ogura T, Tomita A, Hirano I, Shimizu H (2015) Nano-scale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry using the multiple reaction monitoring mode based quantitative platform for analyzing multiple enzymes associated with central metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* using ultra fast mass spectrometry. J Biosci Bioeng 119(1):117−20

Matsushika A, Nagashima A, Goshima T, Hoshino T (2013) Fermentation of xylose causes inefficient metabolic state due to carbon/energy starvation and reduced glycolytic flux in recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS One 8(7):e69005

Mawhinney TP, Robinett RS, Atalay A, Madson MA (1986) Analysis of amino acids as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. J Chromatogr 358(1):231−42

Milne N, Luttik MA, Cueto Rojas HF, Wahl A, van Maris AJ, Pronk JT, Daran JM (2015) Functional expression of a heterologous nickel-dependent, ATP-independent urease in *Saccharomyces cerevisiae*. Metab Eng 30:130−40

Mimura N, Isogai A, Iwashita K, Bamba T, Fukusaki E (2014) Gas chromatography/mass spectrometry based component profiling and quality prediction for Japanese sake. J Biosci Bioeng 118(4):406–14

Mo ML, Palsson BO, Herrgård MJ (2009) Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. BMC Syst Biol 3:37

Monschau N, Stahmann KP, Sahm H, McNeil JB, Bognar AL (1997) Identification of *Saccharomyces cerevisiae* GLY1 as a threonine aldolase: a key enzyme in glycine biosynthesis. FEMS Microbiol Lett 150:55–60

Mori E, Furusawa C, Kajihata S, Shirai T, Shimizu H (2011) Evaluating ^{13}C enrichment data of free amino acids for precise metabolic flux analysis. Biotechnol J 6(11):1377–87

Morrison LD, Smith DD, Kish SJ (1996) Brain *S*-adenosylmethionine levels are severely decreased in Alzheimer's disease. J Neurochem 67(3):1328−31

Mortimer RK, Johnston JR (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. Genetics 113(1):35–43

Mosser M, Kapel R, Chevalot I, Olmos E, Marc I, Marc A, Oriol E (2015) Fractionation of yeast extract by nanofiltration process to assess key compounds involved in CHO cell culture improvement. Biotechnol Prog 31:875–82

Motomura S, Horie K, Kitagaki H (2012) Mitochondrial activity of sake brewery yeast affects malic and succinic acid production during alcoholic fermentation. J Inst Brew 118:22–6

Nevoigt E (2008) Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev 72(3):379–412

Nielsen J, Jewett MC (2008) Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res 8(1):122–31

Nielsen J, Larsson C, van Maris A, Pronk J (2013) Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. Curr Opin Biotechnol 24(3):398–404

Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A (2016) Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. Science 353(6305)

Nishino S, Okahashi N, Matsuda F, Shimizu H (2015) Absolute quantitation of glycolytic intermediates reveals thermodynamic shifts in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking *PFK1* or *ZWF1* genes. J Biosci Bioeng 120(3):280−6

Nugroho RH, Yoshikawa K, Shimizu H (2015) Metabolomic analysis of acid stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci Bioeng 120:396–404

Oba T, Kusumoto K, Kichise Y, Izumoto E, Nakayama S, Tashiro K, Kuhara S, Piper PW (1995) The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. FEMS Microbiol Lett 134(2-3):121–7

Ohashi Y, Hirayama A, Ishikawa T, Nakamura S, Shimizu K, Ueno Y, Tomita M, Soga T (2008) Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS. Mol Biosyst 4:135–47

Ohno S, Furusawa C, Shimizu H (2013) *In silico* screening of triple reaction knockout *Escherichia coli* strains for overproduction of useful metabolites. J Biosci Bioeng 115(2):221−8

Ohta E, Nakayama Y, Mukai Y, Bamba T, Fukusaki E (2016) Metabolomic approach for improving ethanol stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci Bioeng 121(4):399−405

Okahashi N, Kawana S, Iida J, Shimizu H, Matsuda F (2016) GC-MS/MS survey of collision-induced dissociation of tert-butyldimethylsilyl-derivatized amino acids and its application to (13)C-metabolic flux analysis of Escherichia coli central metabolism. Anal Bioanal Chem 408(22):6133−40

Ostergaard S, Olsson L, Nielsen J (2000) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev 64(1):34–50

Patzschke A, Steiger MG, Holz C, Lang C, Mattanovich D, Sauer M (2015) Enhanced glutathione production by evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* strains. Biotechnol J 10(11):1719–26

Perez RE, Jansen PW, Martins JRRA (2012) pyOpt: a Python-based object-oriented framework

for nonlinear constrained optimization. Struct Multidiscip Optim 45:101–18

Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MC, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD (2006) Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. Nature 440(7086):940−3

Sakihama Y, Hasunuma T, Kondo A (2015) Improved ethanol production from xylose in the presence of acetic acid by the overexpression of the *HAA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci Bioeng 119:297–302

Saletu B, Anderer P, Di Padova C, Assandri A, Saletu-Zyhlarz GM (2002) Electrophysiological neuroimaging of the central effects of *S*-adenosyl-L-methionine by mapping of electroencephalograms and event-related potentials and low-resolution brain electromagnetic tomography. Am J Clin Nutr 76(5):1162S−71S

Schlenk F, Depalma RE. The preparation of *S*-adenosylmethionine. J Biol Chem 229(2):1051−7

Shiroma S, Jayakody LN, Horie K, Okamoto K, Kitagaki H (2014) Enhancement of ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strain by disrupting mitophagy function. App Environ Microbiol 80(3):1002–12

Shiomi N, Fukuda H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1990) Production of *S*-adenosyl-L-methionine by *Saccharomyces cerevisiae* cells carrying a gene for ethionine resistance. Biotechnol Bioeng 35:1120–4

Shiozaki S, Shimizu S, Yamada H (1984) Unusual Intracellular Accumulation of *S*-Adenosyl-L-methionine by Microorganisms. Agr Biol Chem 48:2293–2300

Shiozaki S, Shimizu S, Yamada H (1986) Production of *S*-adenosyl-L-methione by *Saccharomyces sake*. J Biotechnol 4 (6):345–54

Shiozaki S, Shimizu S, Yamada H (1989) *S*-Adenosyl-L-methionine Production by *Saccharomyces sake*: Optimization of the Culture Conditions for the Production of Cells with a High *S*-Adenosyl-L-methionine Content. Agr Biol Chem 53:3269–74

Shippy RA, Mendez D, Jones K, Cergnul I, Karpiak SE (2004) *S*-adenosylmethionine (SAM-e) for the treatment of depression in people living with HIV/AIDS. BMC Psychiatry 4:38

Shirai T, Fujimura K, Furusawa C, Nagahisa K, Shioya S, Shimizu H (2007) Study on roles of anaplerotic pathways in glutamate overproduction of *Corynebacterium glutamicum* by metabolic flux analysis. Microb Cell Fact 6:19

Shirai T, Matsuda F, Okamoto M, Kondo A (2013) Evaluation of control mechanisms for *Saccharomyces cerevisiae* central metabolic reactions using metabolome data of eight single-gene deletion mutants. Appl Microbiol Biotechnol 97:3569–77

Shobayashi M, Fujii T, Iefuji H (2007a) Effects of accumulated *S*-adenosylmethionine on growth of yeast cells. Biosci Biotechnol Biochem 71:1595–7

Shobayashi M, Mukai N, Iwashita K, Hiraga Y, Iefuji H (2006) A new method for isolation of *S*-adenosylmethionine (SAM)-accumulating yeast. Appl Microbiol Biotechnol 69:704–10

Shobayashi M, Ukena E, Fujii T, Iefuji H (2007b) Genome-wide expression profile of sake brewing yeast under shaking and static conditions. Biosci Biotechnol Biochem 71:323–35

Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M (2006) Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. J Biol Chem 281:16768–76

Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T (2003) Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. J Proteome Res 2(5):488–94

Sollner S, Deller S, Macheroux P, Palfey BA (2009) Mechanism of flavin reduction and oxidation in the redox-sensing quinone reductase Lot6p from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry 48(36):8636–43

Stückrath I, Lange HC, Kötter P, van Gulik WM, Entian KD, Heijnen JJ (2002) Characterization of null mutants of the glyoxylate cycle and gluconeogenic enzymes in *S. cerevisiae* through metabolic network modeling verified by chemostat cultivation. Biotechnol Bioeng 77(1):61–72

Suástegui M, Guo W, Feng X, Shao Z (2016) Investigating strain dependency in the production of aromatic compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng 113(12):2676–85

Takagi A, Harashima S, Oshima Y (1985) Hybridization and Polyploidization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains by Transformation-Associated Cell Fusion. Appl Environ Microbiol 49(1):244–6

Tang YJ, Chakraborty R, Martín HG, Chu J, Hazen TC, Keasling JD (2007) Flux analysis of central metabolic pathways in *Geobacter metallireducens* during reduction of soluble Fe(III)-nitrilotriacetic acid Appl Environ Microbiol 73(12):3859‒64

Teoh ST, Putri S, Mukai Y, Bamba T, Fukusaki E (2015) A metabolomics-based strategy for identification of gene targets for phenotype improvement and its application to 1-butanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Biofuels 8:144

Thomas KC, Hynes SH, Ingledew WM 2002 Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. Appl Environ Microbiol 68:1616–23

Tkach JM, Yimit A, Lee AY, Riffle M, Costanzo M, Jaschob D, Hendry JA, Ou J, Moffat J, Boone C, Davis TN, Nislow C, Brown GW (2012) Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. Nat Cell Biol 14(9):966–76

Toya Y, Hirasawa T, Morimoto T, Masuda K, Kageyama Y, Ozaki K, Ogasawara N, Shimizu H

(2014) ^{13}C-Metabolic flux analysis in heterologous cellulase production by *Bacillus subtilis* genome-reduced strain. J Biotechnol 179:42–9

Toya Y, Ishii N, Nakahigashi K, Hirasawa T, Soga T, Tomita M, Shimizu K (2010) ^{13}C-metabolic flux analysis for batch culture of *Escherichia coli* and its *pyk* and *pgi* gene knockout mutants based on mass isotopomer distribution of intracellular metabolites. Biotechnol Prog 26(4):975–92

Toya Y, Shimizu H (2013) Flux analysis and metabolomics for systematic metabolic engineering of microorganisms. Biotech Adv 31(6):818–26

Tuma DJ, Casey CA (2003) Dangerous byproducts of alcohol breakdown--focus on adducts. Alcohol Res Health 27(4):285–90

Verduyn C (1991) Physiology of yeasts in relation to biomass yields, Antonie Van Leeuwenhoek. 60 (3-4):325–53

Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, van Dijken JP (1990) Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. J Gen Microbiol 136(3):405–12

Verduyn C, Stouthamer AH, Scheffers WA, van Dijken JP (1991) A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. Antonie van Leeuwenhoek 59:49–63

Verwaal R, Wang J, Meijnen JP, Visser H, Sandmann G, van den Berg JA, van Ooyen AJ (2007) High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Appl Environ Microbiol 73(13):4342−50

Waegeman H, Beauprez J, Moens H, Maertens J, De Mey M, Foulquié-Moreno MR, Heijnen JJ, Charlier D, Soetaert W (2011) Effect of *iclR* and *arcA* knockouts on biomass formation and metabolic fluxes in *Escherichia coli* K12 and its implications on understanding the metabolism of *Escherichia coli* BL21 (DE3). BMC Microbiol 11:70

Walker ME, Val DL, Rohde M, Devenish RJ, Wallace JC (1991) Yeast pyruvate carboxylase: identification of two genes encoding isoenzymes, Biochem Biophys Res Commun 15:176(3):1210–7

Wang L, Hatzimanikatis V (2006) Metabolic engineering under uncertainty--II: analysis of yeast metabolism, Metab Eng 8(2):142–59

Wang Y, Wang D, Wei G, Wang C (2013) Improved co-production of *S*-adenosylmethionine and glutathione using citrate as an auxiliary energy substrate. Bioresour Technol 131:28–32

Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, Eng D, Woolard FX, Regentin R, Horning T, Tsuruta H, Melis DJ, Owens A, Fickes S, Diola D, Benjamin KR, Keasling JD, Leavell MD, McPhee DJ, Renninger NS, Newman JD, Paddon CJ (2012) Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. Proc Natl Acad Sci U S A 109(3):E111–8

Wiechert W (2001) ^{13}C metabolic flux analysis. Metab Eng 3(3):195–206

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

van Winden W, Schipper D, Verheijen P, Heijnen (2001) Innovations in generation and analysis of 2D [(13)C,(1)H] COSY NMR spectra for metabolic flux analysis purposes. J Metab Eng 3(4):322–43

van Winden WA, Wittmann C, Heinzle E, Heijnen JJ (2002) Correcting mass isotopomer distributions for naturally occurring isotopes. Biotechnol Bioeng 80(4):477–9

Wittmann C, Heinzle E (2002) Genealogy profiling through strain improvement by using metabolic network analysis: metabolic flux genealogy of several generations of lysine-producing corynebacteria. Appl Environ Microbiol 68(12):5843–59

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

Yoshikawa K, Tanaka T, Furusawa C, Nagahisa K, Hirasawa T, Shimizu H (2009) Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res 9(1):32–44

Zhao J, Baba T, Mori H, Shimizu K (2004) Effect of *zwf* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate. Metab Eng 6(2):164−74

Zhou J, Liu L, Chen JJ (2011) Improved ATP supply enhances acid tolerance of *Candida glabrata* during pyruvic acid production. Appl Microbiol 110:44–53

原島俊, 高木博史ほか (2013) 酵母の生命科学と生物工学　産業応用から基礎科学へ, 化学同人

株式会社カネカ: Ｓ－アデノシル－Ｌ－メチオニンの吸収性を高める方法およびＳ－アデノシル－Ｌ－メチオニンの吸収性が高められた組成物, WO2010/027014 A1, 2010

独立行政法人酒類総合研究所: Ｓ－アデノシルメチオニン子蓄積酵母の取得方法, P2011-177125A, 2011

三菱瓦斯化学株式会社: 保存安定性に優れたＳ−アデノシル−Ｌ−メチオニン含有乾燥酵母の製造方法、その製造物及びその成型された組成物, JP4479932, 2010

Appendix

Table S1 ^{13}C-MFA に使用するアミノ酸の生合成経路

Amino acids	Reactions	Carbon atom transitions
Ala57	pre_Ala --> Ala57	ABC --> ABC
Ala85	pre_Ala --> Ala85	ABC --> BC
Asp57	Oxa_cyt --> Asp57	ABCD --> ABCD
Asp85	Oxa_cyt --> Asp85	ABCD --> BCD
Asp302	Oxa_cyt --> Asp302	ABCD --> AB
Glu57	aKG --> Glu57	ABCDE --> ABCDE
Glu85	aKG --> Glu85	ABCDE --> BCDE
Glu159	aKG --> Glu159	ABCDE --> BCDE
Gly57	Gly --> Gly57	AB --> AB
Gly85	Gly --> Gly85	AB --> B
Ile85	Oxa_cyt + Pyr_mit --> Ile85	ABCD + EFG --> BFGCD
Ile159	Oxa_cyt + Pyr_mit --> Ile159	ABCD + EFG --> BFGCD
Leu85	Pyr_mit + Pyr_mit + AcCOA_mit --> Leu85	ABC + DEF + GH --> HBCEF
Leu159	Pyr_mit + Pyr_mit + AcCOA_mit --> Leu159	ABC + DEF + GH --> HBCEF
Phe57	E4P + PEP + PEP --> Phe57	ABCD + EFG + HIJ --> EFGIJABCD
Pro85	aKG --> Pro85	ABCDE --> BCDE
Pro159	aKG --> Pro159	ABCDE --> BCDE
Thr57	Thr --> Thr57	ABCD --> ABCD
Thr85	Thr --> Thr85	ABCD --> BCD
Val85	Pyr_mit + Pyr_mit --> Val85	ABC + DEF --> EBFC
Val159	Pyr_mit + Pyr_mit --> Val159	ABC + DEF --> EBFC

Table S2 出芽酵母の高分子組成 [%(w w^{-1})] (Stückrath et al. 2002)

	Component			
Carbon source	Protein	Lipid	Carbohydrate	RNA + DNA
グルコース	40.9	6.5	41.5	7.2
エタノール	44.0	10.2	35.1	6.9

脂質はすべてトリアシルグリセロールと仮定した。

炭水化物は、G6P の重合体と仮定した。

Table S3 出芽酵母のアミノ酸組成 (Stückrath et al. 2002)

Amino acid	content %(mol mol^{-1})	Amino acid	content %(mol mol^{-1})
Ala	9.8	Lys	6.6
Arg	3.9	Met	1.1
Asp/Asn	9.3	Phe	3.8
Cys	0.1	Pro	4.2
Glu/Gln	15.5	Ser	5.3
Gly	8.9	Thr	5.6
His	1.9	Trp	0.7
Ile	5.9	Tyr	2.0
Leu	8.0	Val	7.3

Table S4 出芽酵母の脂肪酸組成 (Förster et al. 2003)

Fatty acid	content %(w w^{-1})	Fatty acid	content %(w w^{-1})
10:0	1.1	16:1	16.6
12:0	4.8	18:0	6.1
14:0	8.8	18:1	25.7
16:0	26.8	18:2	10.1

Table S5 出芽酵母の RNA、DNA 組成 (Förster et al. 2003)

RNA	content %(mol mol^{-1})	DNA	content %(mol mol^{-1})
AMP	23.3	dAMP	29.8
GMP	23.3	dGMP	20.2
CMP	30.6	dCMP	20.2
UMP	22.8	dTMP	29.8

Table S6 タンパク質由来アミノ酸 ^{13}C 濃縮度の実験値と推定値 (実験室酵母 S288C、希釈率 0.06 h^{-1})

Amino acid	Fragment	Origin[a]	^{13}C-enrichment									
			m_0	m_1	m_2	m_3	m_4	m_5	m_6	m_7	m_8	m_9
Ala	M-57	Exp	0.688	0.122	0.032	0.158						
		Sim	0.684	0.125	0.039	0.153						
Ala	M-85	Exp	0.713	0.11	0.177							
		Sim	0.722	0.102	0.176							
Asx[b]	M-57	Exp	0.528	0.242	0.104	0.104	0.022					
		Sim	0.523	0.234	0.109	0.106	0.028					
Asx	M-85	Exp	0.567	0.245	0.148	0.041						
		Sim	0.568	0.236	0.154	0.043						
Asx	M302	Exp	0.72	0.133	0.146							
		Sim	0.721	0.131	0.149							
Glx[c]	M-57	Exp	0.397	0.25	0.222	0.093	0.029	0.008				
		Sim	0.396	0.247	0.223	0.097	0.029	0.009				
Glx	M-85	Exp	0.451	0.268	0.207	0.057	0.017					
		Sim	0.448	0.266	0.210	0.059	0.017					
Glx	M-159	Exp	0.452	0.266	0.207	0.058	0.017					
		Sim	0.448	0.266	0.210	0.059	0.017					
Gly	M-57	Exp	0.765	0.073	0.162							
		Sim	0.757	0.079	0.164							
Gly	M-85	Exp	0.801	0.199								
		Sim	0.798	0.202								
Ile	M-85	Exp	0.413	0.234	0.229	0.087	0.03	0.007				
		Sim	0.407	0.231	0.234	0.088	0.031	0.007				
Ile	M-159	Exp	0.41	0.233	0.229	0.088	0.031	0.009				
		Sim	0.407	0.231	0.234	0.088	0.031	0.007				
Leu	M-85	Exp	0.392	0.245	0.231	0.093	0.032	0.008				
		Sim	0.387	0.246	0.235	0.093	0.032	0.007				
Leu	M-159	Exp	0.384	0.243	0.236	0.095	0.034	0.008				
		Sim	0.387	0.246	0.235	0.093	0.032	0.007				
Phe	M-57	Exp	0.361	0.16	0.131	0.153	0.095	0.049	0.029	0.016	0.004	0.003
		Sim	0.344	0.158	0.136	0.147	0.105	0.053	0.032	0.019	0.004	0.004
Pro	M-85	Exp	0.445	0.271	0.206	0.06	0.018					
		Sim	0.448	0.266	0.210	0.059	0.017					
Pro	M-159	Exp	0.447	0.267	0.208	0.06	0.018					
		Sim	0.448	0.266	0.210	0.059	0.017					
Thr	M-57	Exp	0.53	0.237	0.107	0.103	0.023					
		Sim	0.523	0.234	0.109	0.106	0.028					
Thr	M-85	Exp	0.573	0.242	0.149	0.037						
		Sim	0.568	0.236	0.154	0.043						
Val	M-85	Exp	0.513	0.159	0.259	0.038	0.031					
		Sim	0.515	0.157	0.260	0.038	0.030					
Val	M-159	Exp	0.512	0.153	0.257	0.047	0.031					
		Sim	0.515	0.157	0.260	0.038	0.030					

[a] Exp, GC-MS 分析による測定値; Sim, 計算機処理による推定値

[b] ASX, Asp と Asn

[c] Glx, Glu と Gln

Table S7 タンパク質由来アミノ酸 ^{13}C 濃縮度の実験値と推定値 (実験室酵母 S288C、希釈率 0.1 h^{-1})

Amino acid	Fragment	Origin[a]	^{13}C-enrichment									
			m_0	m_1	m_2	m_3	m_4	m_5	m_6	m_7	m_8	m_9
Ala	M-57	Exp	0.689	0.121	0.034	0.157						
		Sim	0.686	0.122	0.039	0.153						
Ala	M-85	Exp	0.716	0.107	0.177							
		Sim	0.722	0.102	0.175							
Asx[b]	M-57	Exp	0.535	0.240	0.087	0.111	0.026					
		Sim	0.533	0.234	0.089	0.115	0.030					
Asx	M-85	Exp	0.571	0.239	0.148	0.041						
		Sim	0.571	0.231	0.156	0.042						
Asx	M302	Exp	0.735	0.113	0.152							
		Sim	0.734	0.111	0.155							
Glx[c]	M-57	Exp	0.398	0.248	0.223	0.094	0.029	0.008				
		Sim	0.398	0.244	0.223	0.097	0.029	0.009				
Glx	M-85	Exp	0.454	0.264	0.207	0.058	0.017					
		Sim	0.452	0.263	0.209	0.058	0.017					
Glx	M-159	Exp	0.454	0.264	0.207	0.058	0.017					
		Sim	0.452	0.263	0.209	0.058	0.017					
Gly	M-57	Exp	0.764	0.073	0.163							
		Sim	0.760	0.074	0.166							
Gly	M-85	Exp	0.802	0.198								
		Sim	0.798	0.202								
Ile	M-85	Exp	0.415	0.228	0.232	0.087	0.031	0.008				
		Sim	0.411	0.228	0.236	0.087	0.032	0.007				
Ile	M-159	Exp	0.413	0.229	0.232	0.087	0.031	0.009				
		Sim	0.411	0.228	0.236	0.087	0.032	0.007				
Leu	M-85	Exp	0.393	0.244	0.232	0.093	0.032	0.008				
		Sim	0.389	0.245	0.234	0.093	0.032	0.007				
Leu	M-159	Exp	0.385	0.243	0.236	0.095	0.034	0.008				
		Sim	0.389	0.245	0.234	0.093	0.032	0.007				
Phe	M-57	Exp	0.364	0.159	0.132	0.151	0.098	0.049	0.030	0.017	-0.002	0.003
		Sim	0.350	0.152	0.134	0.147	0.105	0.052	0.032	0.019	0.004	0.004
Pro	M-85	Exp	0.449	0.267	0.209	0.058	0.018					
		Sim	0.452	0.263	0.209	0.058	0.017					
Pro	M-159	Exp	0.451	0.262	0.210	0.059	0.018					
		Sim	0.452	0.263	0.209	0.058	0.017					
Thr	M-57	Exp	0.538	0.235	0.085	0.113	0.028					
		Sim	0.533	0.234	0.089	0.115	0.030					
Thr	M-85	Exp	0.575	0.234	0.153	0.038						
		Sim	0.571	0.231	0.156	0.042						
Val	M-85	Exp	0.515	0.157	0.260	0.038	0.030					
		Sim	0.517	0.155	0.260	0.037	0.030					
Val	M-159	Exp	0.514	0.151	0.257	0.046	0.031					
		Sim	0.517	0.155	0.260	0.037	0.030					

[a] Exp, GC-MS 分析による測定値; Sim, 計算機処理による推定値

[b] ASX, Asp と Asn

[c] Glx, Glu と Gln

Table S8 タンパク質由来アミノ酸 ^{13}C 濃縮度の実験値と計算値 (清酒酵母協会 6 号、希釈率 0.06 h^{-1})

Amino acid	Fragment	Origin[a]	^{13}C-enrichment									
			m_0	m_1	m_2	m_3	m_4	m_5	m_6	m_7	m_8	m_9
Ala	M-57	Exp	0.685	0.127	0.038	0.150						
		Sim	0.682	0.129	0.042	0.147						
Ala	M-85	Exp	0.714	0.114	0.172							
		Sim	0.720	0.110	0.170							
Asx[b]	M-57	Exp	0.533	0.242	0.099	0.105	0.021					
		Sim	0.529	0.236	0.102	0.108	0.026					
Asx	M-85	Exp	0.571	0.244	0.147	0.039						
		Sim	0.573	0.236	0.152	0.040						
Asx	M302	Exp	0.726	0.130	0.144							
		Sim	0.722	0.131	0.147							
Glx[c]	M-57	Exp	0.397	0.254	0.221	0.092	0.028	0.007				
		Sim	0.395	0.254	0.221	0.094	0.028	0.008				
Glx	M-85	Exp	0.450	0.273	0.206	0.056	0.015					
		Sim	0.449	0.273	0.204	0.058	0.016					
Glx	M-159	Exp	0.450	0.272	0.204	0.058	0.016					
		Sim	0.449	0.273	0.204	0.058	0.016					
Gly	M-57	Exp	0.760	0.082	0.158							
		Sim	0.757	0.080	0.163							
Gly	M-85	Exp	0.801	0.199								
		Sim	0.798	0.202								
Ile	M-85	Exp	0.415	0.235	0.228	0.086	0.030	0.007				
		Sim	0.412	0.235	0.232	0.085	0.030	0.007				
Ile	M-159	Exp	0.413	0.235	0.228	0.085	0.030	0.009				
		Sim	0.412	0.235	0.232	0.085	0.030	0.007				
Leu	M-85	Exp	0.394	0.249	0.229	0.091	0.030	0.007				
		Sim	0.390	0.250	0.232	0.091	0.031	0.007				
Leu	M-159	Exp	0.386	0.247	0.234	0.093	0.032	0.007				
		Sim	0.390	0.250	0.232	0.091	0.031	0.007				
Phe	M-57	Exp	0.356	0.169	0.135	0.154	0.094	0.049	0.030	0.015	-0.003	0.002
		Sim	0.342	0.160	0.136	0.151	0.102	0.052	0.031	0.018	0.004	0.003
Pro	M-85	Exp	0.444	0.277	0.204	0.059	0.016					
		Sim	0.449	0.273	0.204	0.058	0.016					
Pro	M-159	Exp	0.446	0.273	0.205	0.059	0.017					
		Sim	0.449	0.273	0.204	0.058	0.016					
Thr	M-57	Exp	0.534	0.237	0.103	0.104	0.023					
		Sim	0.529	0.236	0.102	0.108	0.026					
Thr	M-85	Exp	0.577	0.238	0.150	0.034						
		Sim	0.573	0.236	0.152	0.040						
Val	M-85	Exp	0.514	0.165	0.253	0.040	0.028					
		Sim	0.516	0.164	0.254	0.038	0.028					
Val	M-159	Exp	0.512	0.160	0.252	0.048	0.029					
		Sim	0.516	0.164	0.254	0.038	0.028					

[a] Exp, GC-MS 分析による測定値; Sim, 計算機処理による推定値

[b] ASX, Asp と Asn

[c] Glx, Glu と Gln

Table S9 タンパク質由来アミノ酸 ^{13}C 濃縮度の実験値と計算値 (清酒酵母協会 6 号、希釈率 0.1 h^{-1})

Amino acid	Fragment	Origin[a]	^{13}C-enrichment									
			m_0	m_1	m_2	m_3	m_4	m_5	m_6	m_7	m_8	m_9
Ala	M-57	Exp	0.679	0.132	0.039	0.151						
		Sim	0.677	0.133	0.041	0.149						
Ala	M-85	Exp	0.711	0.114	0.175							
		Sim	0.717	0.112	0.171							
Asx[b]	M-57	Exp	0.510	0.253	0.117	0.098	0.023					
		Sim	0.507	0.249	0.118	0.101	0.025					
Asx	M-85	Exp	0.555	0.258	0.145	0.042						
		Sim	0.557	0.252	0.149	0.042						
Asx	M302	Exp	0.710	0.148	0.142							
		Sim	0.708	0.150	0.143							
Glx[c]	M-57	Exp	0.386	0.258	0.222	0.096	0.029	0.008				
		Sim	0.386	0.259	0.222	0.096	0.029	0.008				
Glx	M-85	Exp	0.440	0.279	0.205	0.060	0.016					
		Sim	0.440	0.280	0.204	0.061	0.016					
Glx	M-159	Exp	0.441	0.277	0.204	0.061	0.016					
		Sim	0.440	0.280	0.204	0.061	0.016					
Gly	M-57	Exp	0.752	0.094	0.154							
		Sim	0.748	0.091	0.160							
Gly	M-85	Exp	0.799	0.201								
		Sim	0.795	0.205								
Ile	M-85	Exp	0.402	0.242	0.228	0.091	0.030	0.007				
		Sim	0.399	0.244	0.230	0.090	0.030	0.007				
Ile	M-159	Exp	0.400	0.243	0.228	0.090	0.030	0.009				
		Sim	0.399	0.244	0.230	0.090	0.030	0.007				
Leu	M-85	Exp	0.388	0.248	0.230	0.094	0.032	0.008				
		Sim	0.385	0.250	0.234	0.093	0.032	0.007				
Leu	M-159	Exp	0.382	0.246	0.235	0.096	0.034	0.008				
		Sim	0.385	0.250	0.234	0.093	0.032	0.007				
Phe	M-57	Exp	0.336	0.175	0.139	0.158	0.094	0.050	0.029	0.014	0.003	0.003
		Sim	0.327	0.170	0.138	0.153	0.102	0.053	0.031	0.017	0.004	0.003
Pro	M-85	Exp	0.434	0.284	0.204	0.062	0.016					
		Sim	0.440	0.280	0.204	0.061	0.016					
Pro	M-159	Exp	0.437	0.278	0.205	0.062	0.017					
		Sim	0.440	0.280	0.204	0.061	0.016					
Thr	M-57	Exp	0.510	0.250	0.119	0.098	0.024					
		Sim	0.507	0.249	0.118	0.101	0.025					
Thr	M-85	Exp	0.559	0.254	0.149	0.039						
		Sim	0.557	0.252	0.149	0.042						
Val	M-85	Exp	0.510	0.164	0.256	0.040	0.030					
		Sim	0.512	0.163	0.257	0.039	0.029					
Val	M-159	Exp	0.509	0.159	0.253	0.048	0.030					
		Sim	0.512	0.163	0.257	0.039	0.029					

[a] Exp, GC-MS 分析による測定値; Sim, 計算機処理による推定値

[b] ASX, Asp と Asn

[c] Glx, Glu と Gln

Table S10 タンパク質由来アミノ酸 ^{13}C 濃縮度の実験値と計算値 (清酒酵母協会 6 号、希釈率 0.06 h^{-1}) (エタノール資化)

Amino acid	Fragment	Origin[a]	^{13}C-enrichment									
			m_0	m_1	m_2	m_3	m_4	m_5	m_6	m_7	m_8	m_9
Ala	M-57	Exp	0.012	0.024	0.687	0.276						
		Sim	0.002	0.024	0.681	0.284						
Ala	M-85	Exp	0.010	0.032	0.958							
		Sim	0.005	0.032	0.954							
Asx[b]	M-57	Exp	0.010	0.017	0.452	0.503	0.018					
		Sim	0.001	0.014	0.470	0.488	0.017					
Asx	M-85	Exp	0.013	0.021	0.710	0.256						
		Sim	0.001	0.022	0.726	0.242						
Asx	M302	Exp	0.021	0.687	0.292							
		Sim	0.010	0.699	0.285							
Glx[c]	M-57	Exp	0.000	0.002	0.027	0.696	0.263	0.012				
		Sim	0.000	0.002	0.028	0.693	0.258	0.008				
Glx	M-85	Exp	0.001	0.004	0.036	0.926	0.033					
		Sim	0.000	0.002	0.036	0.920	0.031					
Glx	M-159	Exp	0.000	0.006	0.036	0.918	0.039					
		Sim	0.000	0.002	0.036	0.920	0.031					
Gly	M-57	Exp	0.023	0.713	0.265							
		Sim	0.011	0.714	0.268							
Gly	M-85	Exp	0.028	0.972								
		Sim	0.019	0.976								
Ile	M-85	Exp	0.017	0.004	0.011	0.040	0.699	0.229				
		Sim	0.000	0.000	0.006	0.045	0.701	0.231				
Ile	M-159	Exp	0.016	0.002	0.013	0.043	0.697	0.229				
		Sim	0.000	0.000	0.006	0.045	0.701	0.231				
Leu	M-85	Exp	0.020	0.007	0.001	0.011	0.062	0.899				
		Sim	0.000	0.000	0.000	0.012	0.070	0.899				
Leu	M-159	Exp	0.018	0.006	0.002	0.014	0.073	0.887				
		Sim	0.000	0.000	0.000	0.012	0.070	0.899				
Phe	M-57	Exp	0.016	0.001	0.000	0.001	0.005	0.027	0.283	0.425	0.209	0.032
		Sim	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.032	0.278	0.411	0.208	0.035
Pro	M-85	Exp	0.014	0.012	0.036	0.916	0.022					
		Sim	0.000	0.002	0.036	0.920	0.031					
Pro	M-159	Exp	0.015	0.010	0.036	0.914	0.026					
		Sim	0.000	0.002	0.036	0.920	0.031					
Thr	M-57	Exp	0.015	0.014	0.485	0.474	0.012					
		Sim	0.001	0.014	0.470	0.488	0.017					
Thr	M-85	Exp	0.014	0.019	0.742	0.225						
		Sim	0.001	0.022	0.726	0.242						
Val	M-85	Exp	0.012	0.003	0.009	0.055	0.921					
		Sim	0.000	0.000	0.011	0.061	0.910					
Val	M-159	Exp	0.012	0.003	0.014	0.066	0.906					
		Sim	0.000	0.000	0.011	0.061	0.910					

[a] Exp, GC-MS 分析による測定値; Sim, 計算機処理による推定値

[b] ASX, Asp と Asn

[c] Glx, Glu と Gln

Table S11 細胞内代謝物濃度 (μmol g CDW^{-1})

株	清酒酵母 協会 6 号		清酒酵母 協会 6 号		実験室酵母 S288C		清酒酵母 協会 6 号	
L-メチオニン	−		+		+		+	
酵母エキス (g L^{-1})	5.0		5.0		5.0		0.0	
	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD
Gly	6.8	3.2	23.2	0.5	14.1	0.3	10.4	0.6
Ala	5.3	1.4	35.6	0.5	42.3	0.3	81.3	8.8
Ser	2.5	0.6	2.1	0.1	2.5	0.03	3.3	0.5
Pro	1.8	0.2	13.3	0.6	7.7	0.1	7.2	1.2
Val	28.9	6.3	9.0	0.1	12.8	0.2	4.1	0.8
Thr	3.6	1.4	6.4	0.2	6.4	0.1	7.6	1.0
Cys	0.6	0.1	0.3	0.04	0.6	0.02	0.1	0.04
Ile	1.3	0.8	3.0	0.1	4.3	0.1	2.1	0.5
Leu	2.3	0.7	3.8	0.2	6.6	0.2	1.3	0.4
Asn	6.6	1.2	5.7	0.1	5.1	0.1	5.6	0.9
Asp	5.2	0.5	5.0	0.2	2.4	0.04	2.8	0.6
Gln	28.8	4.5	3.0	0.04	10.8	0.6	6.7	0.9
Lys	30.8	5.4	23.6	0.6	43.9	0.8	18.9	2.3
Glu	80.9	0.9	49.8	3.3	61.7	3.5	46.0	7.0
Met	0.06	0.02	28.2	0.2	38.7	2.5	10.4	0.7
His	18.4	3.6	13.0	0.1	22.3	0.6	11.0	2.2
Phe	0.4	0.2	4.3	0.2	3.4	0.1	1.4	0.4
Arg	18.1	2.9	23.1	0.6	34.8	1.7	18.3	2.7
Tyr	3.9	1.8	3.9	0.1	4.6	0.2	3.1	0.7
Trp	0.4	0.1	0.9	0.1	0.8	0.1	0.5	0.1
Ornithine	1.8	0.4	2.8	0.3	3.7	0.4	3.6	0.3
Citrulline	0.3	0.1	0.03	0.001	0.1	0.01	0.2	0.02
γ-Aminobutyric acid	3.6	1.5	11.6	0.4	5.0	0.1	0.4	0.007
Anthranilic acid	0.003	0.004	0.01	0.0002	0.08	0.01	0.06	0.02
Homoserine	0.8	0.2	0.9	0.1	0.1	0.004	0.5	0.05

ND, not detected.

Table S11 細胞内代謝物濃度 (μmol g CDW^{-1}) (続き)

株	清酒酵母 協会 6 号		清酒酵母 協会 6 号		実験室酵母 S288C		清酒酵母 協会 6 号	
L-メチオニン	−		+		+		+	
酵母エキス (g L^{-1})	5.0		5.0		5.0		0.0	
	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD
G6P	4.0	0.8	0.01	0.003	0.02	0.006	0.2	0.1
F6P	0.6	0.2	0.003	0.001	0.01	0.001	0.06	0.02
G1P	0.1	0.01	0.02	0.001	0.004	0.0005	0.04	0.006
FBP	0.5	0.1	ND	-	0.001	0.002	0.1	0.04
DHAP	0.1	0.0	0.007	0.01	0.003	0.003	0.10	0.03
Glycerol 3-phosphate	0.6	0.2	0.1	0.01	0.07	0.004	0.10	0.02
PGA	2.7	0.7	0.1	0.02	0.2	0.03	0.2	0.03
2PG	0.5	0.1	0.06	0.02	0.1	0.003	0.08	0.03
PEP	1.0	0.3	0.09	0.02	0.2	0.04	0.08	0.04
Acetyl CoA	0.09	0.03	ND	-	0.005	0.0002	0.009	0.002
Citric acid	26.1	6.3	4.4	0.4	1.7	0.215	10.3	3.2
cis-Aconitic acid	0.1	0.02	0.02	0.002	0.01	0.002	0.4	0.09
IsoCit	0.3	0.1	0.05	0.002	0.008	0.001	0.4	0.09
aKG	1.7	0.3	0.2	0.1	0.2	0.02	0.5	0.3
Suc	7.7	1.6	35.6	2.7	32.2	1.1	23.0	4.0
Fum	3.7	0.5	0.2	0.007	0.8	0.09	0.7	0.2
Mal	14.1	2.1	1.1	0.05	5.1	0.3	5.5	1.8
6PG	0.06	0.03	ND	-	ND	-	0.02	0.004
Ru5P	0.1	0.01	0.01	0.0007	0.01	0.002	0.09	0.03
S7P	0.4	0.1	0.0004	0.0007	0.004	0.002	0.02	0.004
Choline	0.04	0.01	0.4	0.1	0.06	0.01	0.5	0.05
Betaine	4.0	0.6	0.5	0.05	0.8	0.02	0.1	0.01
Carnosine	0.03	0.01	0.02	0.004	0.05	0.003	0.09	0.03
Glutathione (GSSG)	0.8	0.2	0.7	0.1	1.1	0.1	2.2	0.4
Glutathionme (GSH)	19.2	3.3	14.1	1.0	23.7	1.1	11.8	3.5

ND, not detected.

Table S11 細胞内代謝物濃度 (μmol g CDW^{-1}) (続き)

株	清酒酵母 協会 6 号		清酒酵母 協会 6 号		実験室酵母 S288C		清酒酵母 協会 6 号	
L-メチオニン	−		+		+		+	
酵母エキス (g L^{-1})	5.0		5.0		5.0		0.0	
	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD
Adenine	0.007	0.002	0.1	0.01	0.02	0.004	0.2	0.05
Uracil	0.5	0.04	0.3	0.03	0.3	0.02	0.4	0.04
Inosine	0.1	0.05	ND	□	0.01	0.001	0.1	0.03
Adenosine	0.07	0.01	0.3	0.004	0.09	0.008	0.04	0.01
Guanosine	0.1	0.04	0.01	0.01	0.004	0.0004	0.1	0.03
Cytidine	0.1	0.03	0.01	0.00	0.003	0.0002	0.007	0.003
Uridine	1.3	0.2	0.3	0.01	0.2	0.004	1.0	0.2
Hypoxanthine	0.04	0.02	0.1	0.01	0.06	0.002	0.1	0.009
IMP	0.004	0.001	0.1	0.01	0.06	0.004	0.4	0.1
AMP	0.1	0.03	2.3	0.2	0.5	0.04	0.4	0.2
GMP	0.01	0.002	1.6	0.1	0.4	0.04	0.2	0.1
CMP	0.02	0.02	1.1	0.1	0.5	0.04	0.06	0.04
UMP	0.02	0.02	3.1	0.2	0.8	0.07	0.2	0.1
ADP	2.3	0.6	0.4	0.1	0.3	0.05	0.7	0.4
GDP	0.2	0.1	0.3	0.03	0.3	0.04	0.5	0.3
CDP	0.1	0.02	0.1	0.01	0.08	0.01	0.1	0.05
UDP	0.2	0.04	0.2	0.05	0.4	0.08	0.4	0.2
ATP	13.6	1.8	0.02	0.01	0.2	0.04	0.8	0.3
GTP	1.2	0.3	0.01	0.003	0.2	0.03	0.5	0.2
CTP	1.2	0.3	0.002	0.003	0.08	0.01	0.1	0.04
UTP	2.1	0.6	0.009	0.003	0.3	0.04	0.6	0.2
Glycolic acid	0.3	0.1	0.3	0.1	0.4	0.1	0.02	0.04
3-hydroxybutiric acid	0.7	0.03	0.04	0.009	0.04	0.001	0.2	0.02
2-Oxoisovaleric acid	0.1	0.03	ND	□	ND	□	0.04	0.006
Gluconic acid	0.1	0.01	0.1	0.008	0.03	0.001	0.2	0.05

ND, not detected.

Table S12 PC1 と PC2 の因子負荷量

	因子負荷量			因子負荷量			因子負荷量	
代謝物	PC1	PC2	代謝物	PC1	PC2	代謝物	PC1	PC2
Gly	2.71	0.49	G6P	−2.97	0.20	Adenine	2.55	1.45
Ala	2.94	−0.60	F6P	−2.97	−0.26	Uracil	−2.74	0.57
Ser	−0.50	−1.84	G1P	−2.59	1.44	Inosine	−2.66	−1.35
Pro	2.97	0.44	FBP	−2.96	0.14	Adenosine	2.22	1.91
Val	−2.82	−0.67	DHAP	−2.65	0.21	Guanosine	−2.63	1.17
Thr	2.56	−0.56	Glycerol 3-phosphate	−2.71	0.66	Cytidine	−2.56	1.38
Cys	−1.67	−2.41	PGA	−2.99	0.00	Uridine	−2.76	0.96
Ile	2.48	−1.23	2PG	−2.96	−0.16	Hypoxanthine	2.47	−0.07
Leu	2.29	−1.86	PEP	−2.95	−0.24	IMP	2.97	0.35
Asn	−1.69	0.75	Acetyl CoA	−2.86	−0.81	AMP	2.77	1.08
Asp	−1.23	2.58	Citric acid	−2.61	1.25	GMP	2.97	0.40
Gln	−2.63	−1.43	*cis*-Aconitic acid	−2.86	0.70	CMP	2.81	−0.11
Lys	−0.10	−2.71	IsoCit	−2.34	1.84	UMP	2.88	0.09
Glu	−2.78	−0.97	aKG	−2.97	0.07	ADP	−2.83	0.55
Met	2.96	−0.47	Suc	2.98	−0.24	GDP	2.47	−0.74
His	−0.62	−2.84	Fum	−2.77	−1.15	CDP	−0.72	−1.20
Phe	2.97	−0.18	Mal	−2.59	−1.51	UDP	2.02	−1.97
Arg	2.10	−2.08	6PG	−2.97	0.37	ATP	−2.91	−0.70
Tyr	0.96	−1.22	Ru5P	−2.97	0.30	GTP	−2.58	−1.51
Trp	2.74	−0.07	S7P	−2.97	−0.17	CTP	−2.58	−1.45
Ornithine	2.48	−1.49	Choline	2.14	2.02	UTP	−2.54	−1.58
Citrulline	−2.67	−1.31	Betaine	−2.95	−0.27	Glycolic acid	−0.16	−1.37
γ-Aminobutyric acid	2.35	1.30	Carnosine	−0.16	−2.81	3-hydroxybutiric acid	−2.94	0.43
Anthranilic acid	1.63	−2.02	Glutathione	0.08	−2.55	2-Oxoisovaleric acid	−2.93	0.26
Homoserine	−0.96	2.79	Glutathionme	−0.49	−2.86	Gluconic acid	−0.92	2.60

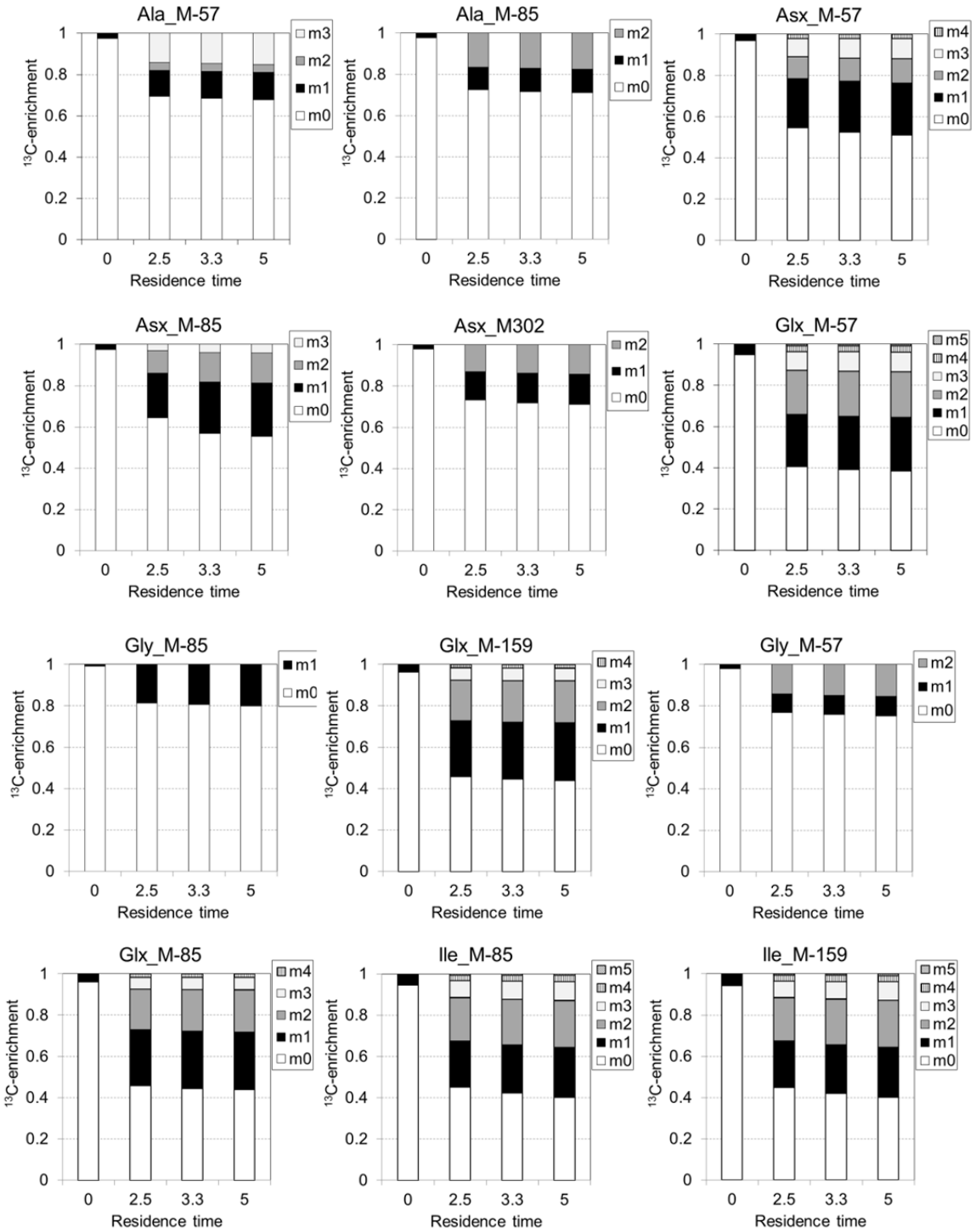


Fig. S1 タンパク質由来アミノ酸の ^{13}C 濃縮度経時変化 (清酒酵母協会 6 号、グルコース資化、希釈率 0.1 h^{-1})

レジデンスタイム (Residence time) は ^{13}C 標識グルコースの流加を開始した時点を 0 とした。各アミノ酸の M−57、M−85、M−159、M302 はフラグメントイオンを表わしている。

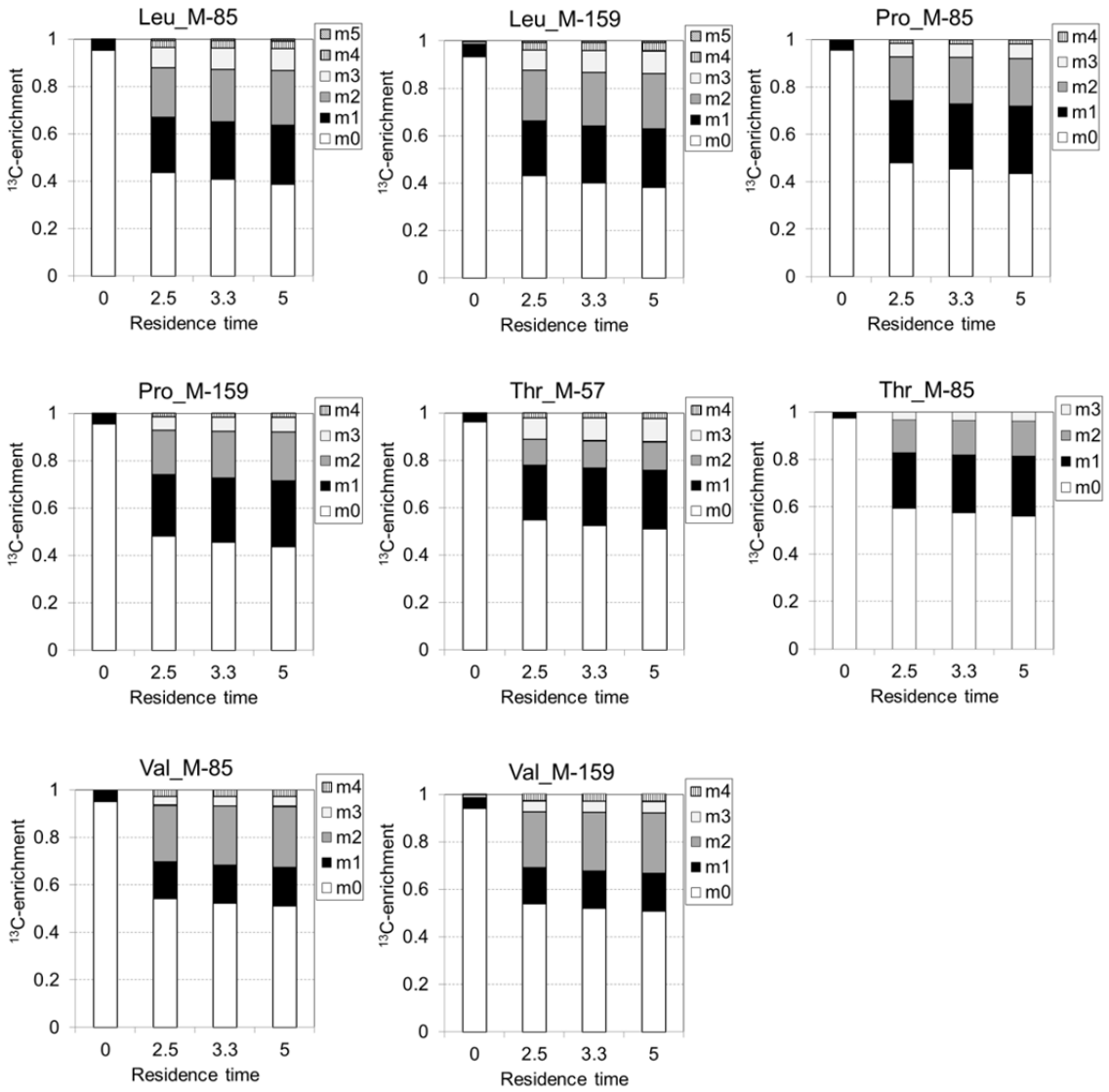


Fig. S1 タンパク質由来アミノ酸の ^{13}C 濃縮度経時変化 (清酒酵母協会 6 号、グルコース資化、希釈率 0.1 h^{-1}) (続き)

レジデンスタイム (Residence time) は ^{13}C 標識グルコースの流加を開始した時点を 0 とした。各アミノ酸の M−57、M−85、M−159、M302 はフラグメントイオンを表わしている。

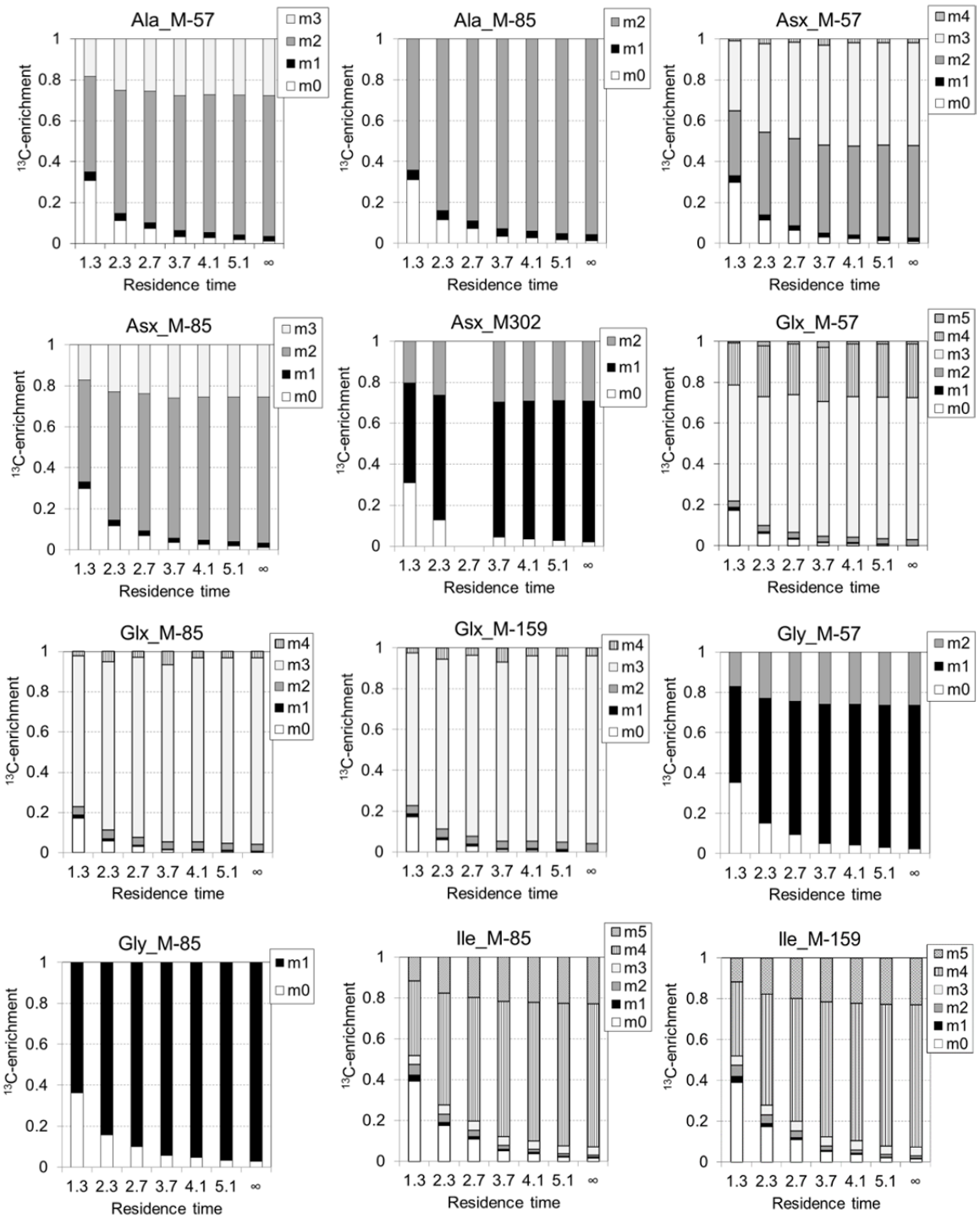


Fig. S2 タンパク質由来アミノ酸の ^{13}C 濃縮度経時変化 (清酒酵母協会 6 号、エタノール資化、希釈率 0.06 h^{-1})

レジデンスタイム (Residence time) は ^{13}C 標識エタノールの流加を開始した時点を 0 とした。各アミノ酸の M−57、M−85、M−159、M302 はフラグメントイオンを表わしている。

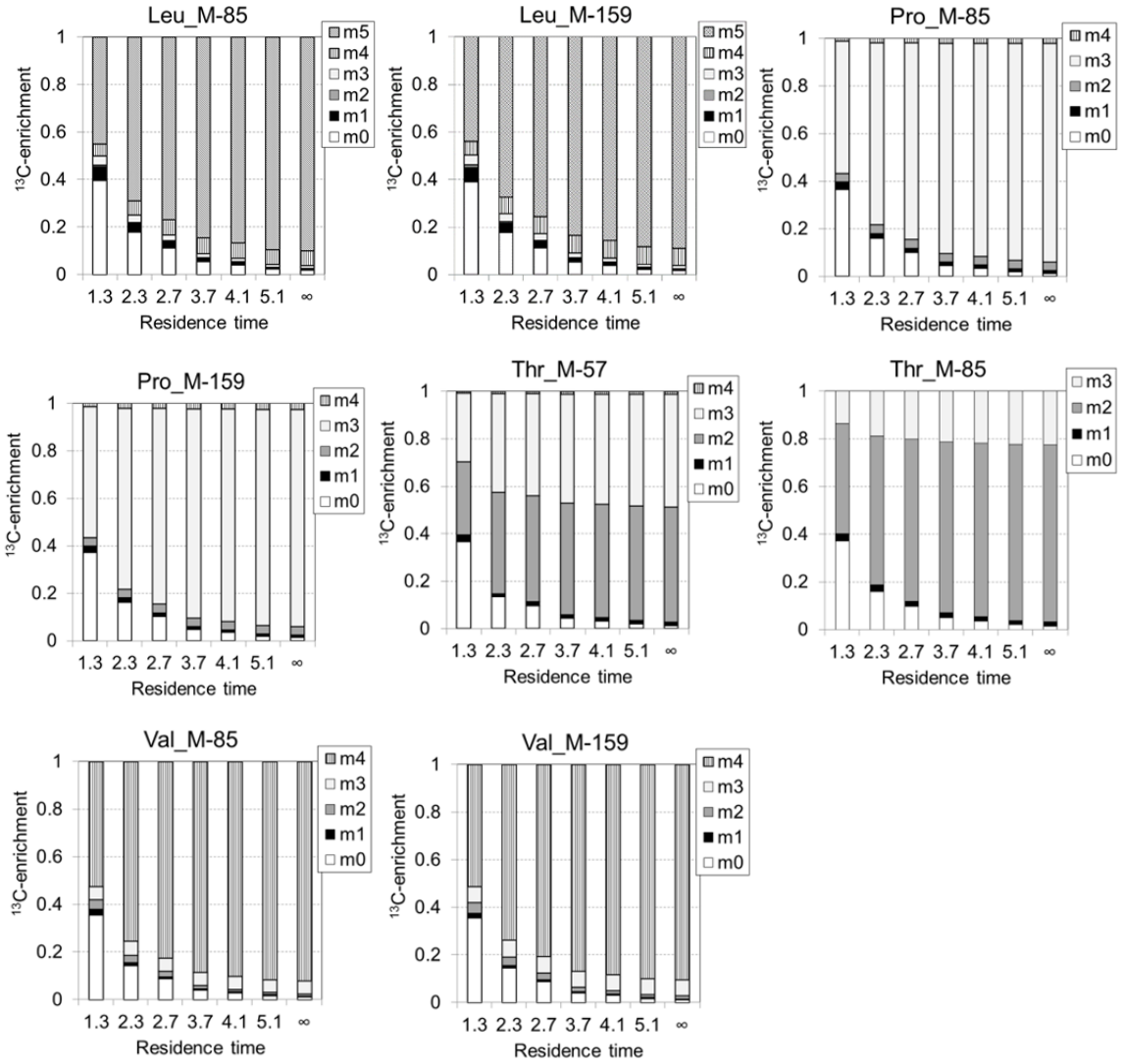


Fig. S2 タンパク質由来アミノ酸の ^{13}C 濃縮度経時変化 (清酒酵母協会 6 号、エタノール資化、希釈率 0.06 h^{-1}) (続き)

レジデンスタイム (Residence time) は ^{13}C 標識エタノールの流加を開始した時点を 0 とした。各アミノ酸の M−57、M−85、M−159、M302 はフラグメントイオンを表わしている。

参考文献 (Appendix)

Stückrath I, Lange HC, Kötter P, van Gulik WM, Entian KD, Heijnen JJ (2002) Characterization of null mutants of the glyoxylate cycle and gluconeogenic enzymes in *S. cerevisiae* through metabolic network modeling verified by chemostat cultivation. Biotechnol Bioeng 77(1):61–72

Förster J, Famili I, Fu P, Palsson BØ, Nielsen J (2003) Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. Genome Res 13(2):244–53

本論文で用いた略語

中間代謝物

2PG: 2-ホスホグリセリン酸 (2-phosphoglycerate)
6PG: 6-ホスホグルコン酸 (6-phosphogluconate)
aKG: α-ケトグルタル酸 (α-ketoglutarate)
Ac: 酢酸 (acetate)
Ac_ex: 酢酸 (細胞外) (extracellular acetate)
AcAl: アセトアルデヒド (acetaldehyde)
AcCOA_cyt: アセチル-CoA (細胞質) (acetyl-CoA in cytosol)
AcCOA_mit: アセチル-CoA (ミトコンドリア) (acetyl-CoA in mitochondria)
Cit_ex: クエン酸 (細胞外) (extracellular citrate)
DHAP: ジヒドロキシアセトンリン酸 (dihydroxyacetone phosphate)
E4P: エリトロース-4-リン酸 (erythrose-4-phosphate)
EtOH: エタノール (ethanol)
EtOH_ex: エタノール (細胞外) (extracellular ethanol)
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)
G1P: グルコース-1-リン酸 (Glucose-1-phosphate)
G6P: グルコース-6-リン酸 (glucose-6-phosphate)
GAP: グリセルアルデヒド-3-リン酸 (Glyceraldehyde 3-phosphate)
Glc: グルコース (glucose)
Glxy: グリオキシル酸 (glyoxylate)
Glyc_ex: グリセロール (細胞外) (extracellular glycerol)
IsoCit: イソクエン酸 (isocitrate)
Lac_ex: 乳酸 (細胞外) (extracellular lactate)
PGA: 3-ホスホグリセリン酸 (3-phosphoglycerate)
Mal: リンゴ酸 (malate)
Mal_ex: リンゴ酸 (細胞外) (extracellular malate)
PEP: ホスホエノールピルビン酸 (phosphoenolpyruvate)
Pyr_cyt: ピルビン酸 (細胞質) (pyruvate in cytosol)
Pyr_mit: ピルビン酸 (ミトコンドリア) (pyruvate in mitochondria)
Pyr_ex: ピルビン酸 (細胞外) (extracellular pyruvate)
Oxa_cyt: オキサロ酢酸 (細胞質) (oxaloacetate in cytosol)
Oxa_mit: オキサロ酢酸 (ミトコンドリア) (oxaloacetate in mitochondria)
Ru5P: リブロース-5-リン酸 (ribulose-5-phosphate)

R5P: リボース-5-リン酸 (ribose-5-phosphate)
S7P: セドヘプツロース-7-リン酸 (sedoheptulose-7-phosphate)
Suc: コハク酸 (succinate)
Suc_ex: コハク酸 (細胞外) (extracellular succinate)
THF: テトラヒドロ葉酸 (tetrahydrofolate)
Xu5P: キシルロース-5-リン酸 (xylulose-5-phosphate)

アミノ酸

Ala: アラニン (alanine)
Asn: アスパラギン (asparagine)
Asp: アスパラギン酸 (aspartic acid)
Gln: グルタミン (glutamine)
Glu: グルタミン酸 (glutamate)
Gly: グリシン (glycine)
His: ヒスチジン (histidine)
Ile: イソロイシン (isoleucine)
Leu: ロイシン (leucine)
Lys: リシン (lysine)
Met: メチオニン (methionine)
Phe: フェニルアラニン (phenylalanine)
Pro: プロリン(proline)
Ser: セリン (serine)
Thr: トレオニン (threonine)
Trp: トリプトファン (tryptophan)
Tyr: チロシン (tyrosine)
Val: バリン (valine)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究の場を与えて下さり、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、前田太郎教授に心より感謝申し上げます。研究方針や実験結果について議論をして頂き、熱く御指導を頂きました代謝情報工学講座の松田史生准教授に心より感謝申し上げます。代謝フラックス解析やフラックスバランス解析について御助言を頂きました戸谷吉博助教に深く感謝申し上げます。代謝フラックス解析について基礎から御指導を頂きました理化学研究所生命システム研究センターの古澤力博士 (元代謝情報工学講座准教授) に深く感謝申し上げます。実験方法について有益な御助言を頂きました、東京工業大学の平沢敬准教授 (元代謝情報工学講座助教)、ならびに吉川勝徳博士 (元代謝情報工学講座助教) に深く感謝申し上げます。CE-TOFMS 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。当時代謝情報工学講座に所属されていた梶畠秀一博士には、代謝フラックス解析について基礎から教えて頂きました。厚く、御礼申し上げます。主成分分析について御助言を頂きました当時代謝情報工学講座に所属されていたRiyanto Heru Nugroho 博士に深く感謝いたします。岡橋伸幸氏には、分析方法について御助言を頂きました。心より感謝いたします。前田昂亮氏には、代謝フラックス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。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。研究の御支援を頂きました株式会社カネカの鷲見泰弘博士、古川直樹博士、福井祥文博士に深く感謝いたします。有益な情報を提供して頂きました株式会社カネカの上田真氏、久保博司氏に感謝いたします。実験をサポートして頂いた大阪大学カネカ基盤技術協働研究所の稲葉由美氏に心より感謝いたします。様々な面でお世話になりました大阪大学カネカ基盤技術協働研究所のみなさまにも感謝いたします。最後に、これまでの学生生活のあらゆる面で支えて頂いた両親と妻に、深く感謝いたします。