

|              |                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 遊離代謝物質に基づく物質生産大腸菌およびがん細胞の <sup>13</sup> C代謝フラックス解析に関する研究                                                                                                                                                                        |
| Author(s)    | 岡橋, 伸幸                                                                                                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 2017, 博士論文                                                                                                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/61862">https://hdl.handle.net/11094/61862</a>                                                                                                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                                                                                                 |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;大阪大学の博士論文について&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 氏 名 （ 岡橋 伸幸 ）                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                          |
| 論文題名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 遊離代謝物質に基づく物質生産大腸菌およびがん細胞の <sup>13</sup> C代謝フラックス解析に関する研究 |
| <p>論文内容の要旨</p> <p>細胞増殖や物質生産は、ともに炭素源の代謝によって供給される中間体と還元力を必要とする。代謝は生命の基本システムであるため、幅広い分野と関わりがある。例えば、微生物代謝を使ったイソプロピルアルコール（IPA）などの有用物質生産では、生産性の高まる増殖停止期の細胞内代謝を最適化する必要がある。また、正常細胞とは異なる代謝を行うがん細胞では、増殖のために活性化している代謝反応を見出すことが抗がん剤の標的選定につながる。これら2つの課題は中心代謝経路のフラックス分布を計測する点で共通している。フラックス分布は、<sup>13</sup>C標識した炭素源を細胞に取り込ませ、代謝物の<sup>13</sup>C標識割合を質量分析装置で計測する<sup>13</sup>C代謝フラックス解析法で推定できる。これまで実施されてきたタンパク由来アミノ酸に基づく従来法はタンパク質合成が低下し、代謝定常を長時間維持できない増殖停止微生物や接着性がん細胞に適用できない。そこで、本研究では、遊離代謝物質に基づくフラックス解析法を構築し、これを用いて増殖停止期のIPA生産大腸菌やがん抑制遺伝子<i>p53</i>欠損モデルがん細胞で活性化している反応を見出し、生物種や増殖状態とフラックス分布の関係性を議論することを目的とした。</p> <p>本学位論文は第1章から第6章により構成される。第1章では本研究の背景と目的について記述した。第2章では、遊離代謝物質の回収法を検討し、遊離アミノ酸の回収にはフィルター法、中間代謝物質の回収にはコールドメタノール法が適していることを明らかにした。第3章では、計測できる遊離代謝物質とフラックスの95%信頼区間の関係を調べた。種々の培養系で共通して計測できる遊離アミノ酸4種類を見出し、これらを利用することで実用に堪えるフラックス解析が可能であることを示した。さらに、タンデム四重極型質量分析装置を使って遊離代謝物質の新規フラグメントを見出し、95%信頼区間を平均20%狭くすることができた。第4章では、増殖停止期のIPA生産大腸菌のフラックス解析を行い、酸化的ペントースリン酸経路やTCAサイクルのフラックスが増加していることを見出した。さらに、この結果に基づき、脱炭酸経路を迂回できるEntner-Doudoroff経路を活性化することで、IPA生産性の向上に成功した。第5章では、<i>p53</i>ノックアウトマウス軟部腫瘍由来細胞株のフラックス解析を行い、リンゴ酸NADP<sup>+</sup>オキシドリダクターゼの反応がNADPHを再生する主要な反応であることを見出した。第6章では本研究で得られた知見をまとめ、各生物種や増殖状態と代謝フラックスの大きさや分布の共通点と相違点を議論した。</p> |                                                          |

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 岡橋 伸幸 ) |     |            |
|---------------|-----|------------|
|               | (職) | 氏 名        |
| 論文審査担当者       | 主 査 | 教授 清水 浩    |
|               | 副 査 | 教授 松田 秀雄   |
|               | 副 査 | 教授 若 宮 直 紀 |
|               | 副 査 | 教授 前田 太郎   |

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、遊離代謝物質に基づく物質生産大腸菌、および、がん細胞の $^{13}\text{C}$ 代謝フラックス解析の研究に関するものである。細胞の代謝反応の大きさを定量的に解析する手法の開発とその微生物、および、がん細胞への適用を行って有効性を示している。

第1章は序論である。本研究の背景と目的について述べている。

第2章では、代謝フラックス解析を実施するための遊離代謝物質の回収法を検討し、遊離アミノ酸の回収にはフィルター法、中間代謝物質の回収にはコールドメタノール法の有効性を明らかにしている。

第3章では、計測できる遊離代謝物質とフラックスの95%信頼区間の関係を調べている。種々の培養系で共通して計測できる遊離アミノ酸を見出し、これらを利用することで代謝の特徴を定量的に議論することができる精度が得られることを示している。また、タンデム四重極型質量分析装置を使った場合に有効に活用できる遊離代謝物質の新規フラグメントについて検証している。

第4章では、工業的に有効なイソプロピルアルコール (IPA) 生産大腸菌の増殖停止期のフラックス解析を行い、特徴づけを行うとともに、解析結果に基づいて、収率を向上させる経路を提案し活性化することで、IPA生産性の向上に成功している。

第5章では、p53ノックアウトマウス軟部腫瘍由来細胞株の代謝フラックス解析を行い、NADPHを再生する主要な反応について議論している。

第6章では本研究で得られた知見をまとめ、各生物種や増殖状態と代謝フラックスの大きさや分布の共通点と相違点を議論している。

本論文では、工業微生物の代謝の改良やがん細胞の代謝生理学的特徴をとらえるのに有効な代謝フラックス解析法の開発とこれを用いた代謝フラックスの定量解析による細胞の特徴づけを行って、代謝改良や細胞の状態の理解への道筋を示している。また、遊離代謝物質の回収法や取得されたデータから代謝フラックスが高精度に得られることを示しており、工学的、情報科学的に価値ある成果が得られている。よって、本論文は博士 (情報科学) の学位論文として価値のあるものと認める。