



Title	13C代謝フラックス解析に基づいた微生物のNADPH再生および消費の収支に関する研究
Author(s)	和田, 圭介
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/69728">https://doi.org/10.18910/69728</a>
rights	This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

<sup>13</sup>C 代謝フラックス解析に基づいた  
微生物の NADPH 再生および消費の収支  
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 2018 年 1 月

和田 圭介



## 学位取得に関わる発表論文

### 1. 学術雑誌

[1-1] Keisuke Wada, Yoshihiro Toya, Satomi Banno, Katsunori Yoshikawa, Fumio Matsuda, and Hiroshi Shimizu:  $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis for mevalonate-producing strain of *Escherichia coli*, *J. Biosci. Bioeng.* **123**(2), 177-182, (2017) (博士論文第2章)

### 2. 国際会議

[2-1] Keisuke Wada, Yoshihiro Toya, Fumio Matsuda, and Hiroshi Shimizu:  $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis for mevalonate-producing strain of *Escherichia coli*, *Metabolic Engineering* 11, Hyogo, Japan, Jun. 2016 (博士論文第2章)

[2-2] Keisuke Wada, Kiyoka Uebayashi, Yoshihiro Toya, Yudai Dempo, Sastia Putri, Fumio Matsuda, Eiichiro Fukusaki, James C Liao, and Hiroshi Shimizu: Isotopically non-stationary  $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis of *n*-butanol production in *Synechococcus elongatus*, *i-BioP* 2016, Busan, Korea, Dec. 2016 (博士論文第3章)

[2-3] Keisuke Wada, Yoshihiro Toya, Fumio Matsuda, and Hiroshi Shimizu:  $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis of mevalonate production in *Escherichia coli*, 8<sup>th</sup> *iBioK*, Hyogo, Japan, Feb. 2017 (博士論文第2章)

## 梗概

微生物は、化学的プロセスによる生産が困難な物質を合成あるいは分解できるため、化学的プロセス以外の物質生産宿主として注目されている。微生物ごとに資化する炭素源は異なるものの、中心代謝経路を介して代謝した炭素源を細胞合成および有用物質生産に充てる点で共通している。また、中心代謝経路には、細胞増殖あるいは有用物質生産に用いられる補酵素に関わる反応が多く存在する。補酵素は酵素反応の際に酸化力あるいは還元力として細胞内で循環的に利用されるため、微生物の代謝は酸化還元バランスによる制約があると言える。すなわち、有用物質を効率的に生産する微生物を創出するには、中心代謝経路上の炭素の流れ(フラックス)、および補酵素の再生/消費速度を定量的に理解することが求められる。フラックスは、単位時間あたりの単位菌体量あたりの化学反応量を指す。生理条件下におけるフラックスは、安定同位体による追跡実験、および計算機上のシミュレーションを組み合わせ、 $^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析で求められる。 $^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析は中心代謝経路上の炭素の流れの方向および大きさを明らかにできるため、補酵素の再生/消費速度の理解、ひいては代謝の定量的な理解に寄与する。

微生物は栄養条件の観点から、2種類に大別できる。従属栄養生物に分類される大腸菌は、グルコースなどの有機化合物を炭素源として生育および物質生産でき、既に工業的な有用物質生産系が構築されている微生物である。大腸菌は中心代謝経路を介したグルコースの代謝によって有用物質生産の骨格となる炭素、および還元力を確保するため、 $^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析を用いて中心代謝経路上のフラックス分布を求めることで、補酵素の再生/消費の収支を見積もれる。独立栄養生物に分類されるシアノバクテリアは、大気中の二酸化炭素を用いて生育および物質生産できるため、環境負荷の少ない宿主として注目されている。シアノバクテリアは炭素源の他に、還元力の確保のためのエネルギー源を要する。シアノバクテリアの場合、光化学系と称される光エネルギーの変換機構を有しており、中心代謝経路と併せて補酵素の再生に寄与している。光化学系による補酵素の再生は酸素発生を伴うため、この速度から補酵素の再生速度を見積もることができ、 $^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析から見積もった中心代謝経路による補酵素の補酵素の再生/消費の収支と照合することで、シアノバクテリアの代謝全体を評価できるようになる。

本研究では、微生物に広く利用できるNADPH再生/消費速度を尺度とし、有用物質を効率的に生産する微生物を創出する上で有効な代謝系の設計原理に関する情報の抽出を目的とし、栄養条件の異なる微生物を例に挙げ、それぞれ $^{13}\text{C}$ 代謝フラックス解析に供した。

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、目的、および構成について記述した。

第2章では、メバロン酸を生産する大腸菌を対象にし、メバロン酸の高生産化に有効な代謝改変戦略の立案を目指した。メバロン酸生産には還元力として補酵素 NADPH を要する。<sup>13</sup>C 代謝フラックス解析の結果、メバロン酸生産に必要な NADPH はトランスヒドロゲナーゼによって再生されることが明らかになった。また、計算機上の代謝シミュレーションの結果と比較したところ、メバロン酸の生産能力を向上させるには、炭素散逸のあるペントースリン酸回路、メバロン酸生合成経路と競合関係にあるクレブス回路および酢酸生合成経路の遮断が重要であることを明らかにした。

第3章では、*n*-ブタノールを生産するシアノバクテリアを対象にし、*n*-ブタノールの高生産化に有効な代謝改変戦略の立案を目指した。<sup>13</sup>C 代謝フラックス解析の結果、炭素の散逸反応を含むペントースリン酸経路のフラックスが大きく、効率的な炭素代謝が行われていないことを明らかにした。中心代謝経路上の反応による NADPH の再生/消費速度を積算したところ、光化学系による NADPH 再生速度の低下が示された。これらの知見を統合し、*n*-ブタノール生産能力を向上させるには、ペントースリン酸経路の遮断による炭素散逸の防止、*n*-ブタノールによって減少した光化学系のタンパク質の発現強化による復旧、および細胞内 *n*-ブタノールの排出による光化学系の保護が有効であることを見出した。

第4章では、光化学系による NADPH 再生に関する知見を集積するため、NADPH の再生/消費速度に摂動を与える呼吸鎖に関する遺伝子の破壊株を対象にし、物質生産に向けた代謝改変戦略に関する知見を抽出した。<sup>13</sup>C 代謝フラックス解析の結果、遺伝子破壊株は二酸化炭素の固定速度の低下に伴い、増殖速度および光化学系による NADPH の再生速度の低下が示された。一方、酸素発生速度から推定された光化学系による NADPH の再生速度は野生型株よりも大きかった。これらの知見を統合し、遺伝子破壊株は野生型株に比べて、直線的電子伝達経路による NADPH 再生速度が低下したことを明らかにした。NADPH 過多状態を、直線的電子伝達経路による電子伝達速度の低下によって防ぐのではなく、有用物質生産によって消費できれば、還元力不足による物質生産速度の低下を防げるかもしれない。

第5章では、本研究の結果を総括し、<sup>13</sup>C 代謝フラックス解析で得られた各栄養生物のフラックス分布および NADPH 再生/消費速度の情報から代謝システム中の問題点を抽出し、合理的な細胞工場の構築に向けた展望を述べ、結言とした。

# 目次

<b>第1章 序論</b> .....	<b>9</b>
1-1 代謝および補酵素.....	9
1-2 微生物による物質生産.....	11
1-3 有用物質生産宿主として用いられる微生物.....	13
1-4 <sup>13</sup> C 代謝フラックス解析.....	14
1-5 本博士論文の対象.....	18
1-6 本博士論文の構成.....	20
<b>第2章 メバロン酸を生産する大腸菌の代謝解析</b> .....	<b>22</b>
2-1 緒言.....	22
2-2 実験材料および実験方法.....	24
2-2-1 培地組成および使用菌株.....	24
2-2-2 細胞濁度および乾燥菌体重量測定.....	25
2-2-3 培養条件.....	25
2-2-4 培地成分の測定.....	25
2-2-5 GC-MS による <sup>13</sup> C 標識割合の測定.....	26
2-2-6 安定同位体定常状態における <sup>13</sup> C-MFA.....	27
2-2-7 フラックスバランス解析.....	28
2-2-8 リンゴ酸酵素の活性測定.....	29
2-3 結果および考察.....	29
2-3-1 MVA 生産大腸菌(改変株)の生育特性.....	29
2-3-2 物質収支に基づく MVA 生産の評価.....	32
2-3-3 コントロール株および改変株のフラックス分布の比較.....	33
2-3-4 MVA の高生産を指向した代謝改変箇所予測.....	37
2-4 結言.....	38
<b>第3章 n-ブタノールを生産する <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 の代謝解析</b> .....	<b>41</b>
3-1 緒言.....	41
3-2 実験材料および実験方法.....	43
3-2-1 培地組成および使用菌株.....	43
3-2-2 細胞濁度および乾燥菌体重量測定.....	43
3-2-3 培養条件.....	43

3-2-4	培地成分の測定	44
3-2-5	細胞内グリコーゲンの測定	44
3-2-6	酸素発生速度の測定	44
3-2-6	LC-MS/MS による $^{13}\text{C}$ 標識割合の測定	45
3-2-7	nano LC-MS/MS によるタンパク質量の測定	46
3-2-8	安定同位体非定常状態における $^{13}\text{C}$ -MFA	47
3-3	結果および考察	47
3-3-1	生育特性の評価	47
3-3-2	各中間代謝物の $^{13}\text{C}$ 標識割合の測定	49
3-3-3	コントロール株および改変株の代謝フラックス分布の比較	50
3-3-4	光化学系の機能低下の検証	54
3-4	結言	56
<b>第4章 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 の直線的電子伝達経路の稼働率の解明</b>		<b>59</b>
4-1	緒言	59
4-2	実験材料および実験方法	61
4-2-1	培地組成および使用菌株	61
4-2-2	細胞濁度および乾燥菌体重量測定	61
4-2-3	培養条件	61
4-2-4	培地成分の測定	62
4-2-5	GC-MS による $^{13}\text{C}$ 標識割合の測定	62
4-2-6	安定同位体定常状態における $^{13}\text{C}$ -MFA	62
4-2-7	酸素発生速度の測定	62
4-3	結果および考察	63
4-3-1	生育特性の評価	63
4-3-2	各中間代謝物の $^{13}\text{C}$ 標識割合の測定	64
4-3-3	コントロール株および改変株の代謝フラックス分布の比較	66
4-3-4	酸素発生速度の測定	69
4-4	結言	72
<b>第5章 結論</b>		<b>75</b>
5-1	各章の結果のまとめ	75
5-2	$^{13}\text{C}$ -MFA と他の解析技術の融合による代謝状態の理解	77
5-3	栄養条件の異なる生物種のフラックス分布に基づく有用物質生産	79

5-4 栄養条件の異なる生物種の NADPH 生産/消費速度からみた有用物質生産.....	81
参考文献.....	84
付録.....	97
略称一覧.....	116
謝辞.....	119

# 第1章 序論

## 1-1 代謝および補酵素

生物は外界から化合物を取り込み、様々な酵素による生化学反応を介して物質を合成あるいは分解する。この諸反応を代謝と称する。代謝を触媒する酵素は翻訳後修飾、アロステリック制御、遺伝子の発現量および代謝物量などに依存して活性が複雑に変動するため、代謝は細胞内物質群の挙動を全て反映した最終的な表現型として生体システムの上層に位置している。代謝は、細胞合成に必要な補酵素などのエネルギー物質ならびに細胞構成成分であるタンパク質、糖、脂質、および核酸などの生合成に関与している一次代謝、および生命活動に必ずしも必要ではない物質の生合成に関与している二次代謝に大別される。一次代謝の中で最も重要な反応として、中心代謝経路が挙げられる。中心代謝経路は生物に最も重要な炭素源(例;グルコース、二酸化炭素など)を確保するために利用される。中心代謝経路にはエムデン-マイヤーホフ-パルナス(EMP)経路、ペントースリン酸(PP)経路、グリオキシル酸経路、およびクレブス(TCA)回路が含まれ、エネルギー生産および細胞構成成分の前駆体が合成される(図 1-1)。生物種によってはエントナー-ドウドロフ(ED)経路あるいはカルビン-ベenson-ベッシャム(CBB)回路を有するなどの差異は見られるものの、代謝ネットワークの構造自体は似通っている。しかし、各代謝経路の利用度は生物種あるいは生育環境に応じて異なる。従って、各代謝経路の利用度の違いを理解することは、生物機能の解明につながると考えられる。



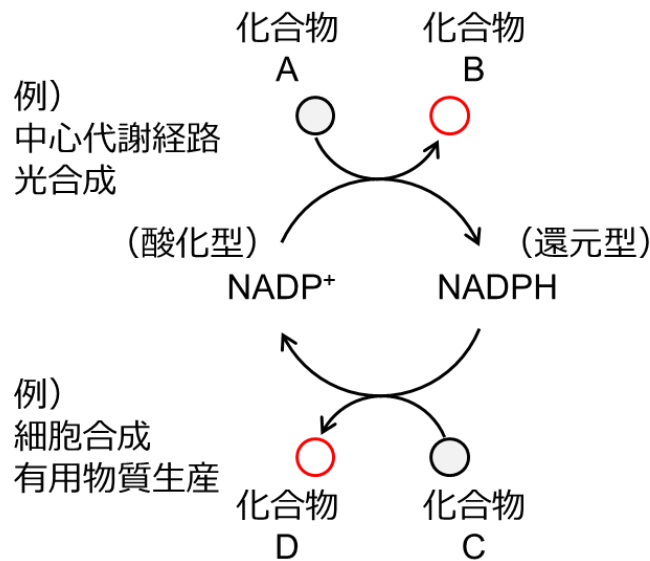


図 1-2 補酵素 NADPH の酸化還元に関わる細胞内の反応

## 1-2 微生物による物質生産

微生物は常温・常圧の細胞内において、化学的プロセスによる生産が困難な物質を合成あるいは分解できるため、化学的プロセス以外の物質生産方法の宿主として注目されている。また、有用物質の多くは中心代謝経路上の代謝物から生合成されるため、外来遺伝子の導入、あるいは内在遺伝子の改変により目的化合物の高生産株を構築できる。現在までに、大腸菌 *Eshcerichia coli* によるコハク酸生産、コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* によるグルタミン酸生産、および出芽酵母 *Saccaromyces cerevisiae* によるエタノール生産などが実用化している (Wendisch *et al.*, 2006, Ostergaard *et al.*, 2000)。また、近年では、化石燃料資源の枯渇問題を背景とし、微生物の代謝を利用した高級アルコールおよびポリマー原料の生産も試みられている (Yan *et al.*, 2009, Jang *et al.*, 2012)。ただし、微生物の代謝状態は必ずしも物質生産に適しているとは限らない。例えば、*S. cerevisiae* は元来キシロースを資化することができないため、野生型株では木質バイオマスの糖化液を効率的に利用できない。この問題に対し、遺伝子工学的手法を用いてキシロース異化酵素をコードする 2 種類の遺伝子を導入することで、*S. cerevisiae* にキシロース資化性を付加することに成功した (Ho *et al.*, 1998, Kuyper *et al.*, 2003, Katahira and Tokuhiko, 2011)。導入した反応経路において、第一反応では NADPH を還元力、第二反応では NAD<sup>+</sup> を酸化力としてキシロースが代謝される。しかし、導入した遺伝子の補酵素特異性が異なるため、補酵素の酸化還元バランスが崩れ、キシロースの代謝効率が上がらない現象が観察されている。このように、一部の代謝システムの改変に伴い細胞の代謝上の問題点が増える問題を解消するためには、遺伝子、酵素、および代謝物の発現状

態を包括的に理解した上で適切な改変を施す手法、すなわち代謝工学的な手法の適用が有効である。さらなる研究の末、酸化還元バランスに注目した代謝の改変によって、*S. cerevisiae* のキシロースの代謝機能の改善に成功した(Träff *et al.*, 2001、Roca *et al.*, 2003、Verho *et al.*, 2003)。近年の代謝工学は、生体システムの構成要素である遺伝子、酵素、あるいは代謝物の一斉定量手法(オミクス解析)と併せて議論されることが多く、分析対象株において有意に増減した物質から代謝上の問題点を同定することに成功している(Vucic *et al.*, 2012、Park *et al.*, 2005)。一方で、細胞構成成分の発現状態が必ずしも代謝状態に反映されない例も報告されており(Chen *et al.*, 2002)、行った改変が生体システムの最終表現型である代謝システム全体に与える影響を測定することが望まれる。

微生物を用いた物質生産を行う上で、与えた化合物を素早く目的化合物に変換すること、およびその変換効率を高めることが命題の一つである。微生物による物質生産能力は比速度(mmol/gDCW/h; 単位時間あたりの単位乾燥菌体量が生産あるいは消費する物質質量)について評価される。理想的な物質生産の系は与えた炭素源の比消費速度が大きく、目的化合物の比生産速度が大きい状態を指す。好気条件下において、対数増殖期中の細胞では与えた炭素源の比消費速度が最も高い状態到達する(Schulze and Lipe, 1964、van Hoek *et al.*, 1998)。増殖期は微生物の活動が最も活発な時期であるため、流加培養および連続培養などを用いて増殖期を維持させた微生物に物質生産させる研究が多く存在する(Tabata and Hashimoto, 2004、He *et al.*, 2014、Lan *et al.*, 2013)。また、有用物質の多くは、生合成に還元力として補酵素類を利用する(表 1-1)。そのため、目的化合物の生産速度の向上には補酵素の消費速度の向上も伴うことを意味する。ただし、補酵素を還元できる中心代謝経路上の反応は限られているため、目的化合物の生産による補酵素の消費と中心代謝経路による補酵素の生産を併せて考慮する必要がある。従って、細胞内で循環的に利用される補酵素の生産および消費速度を定量的に把握することは、物質生産中の代謝システムを維持する上で重要な情報源になりうる。

表 1-1 これまでに構築された微生物を用いた物質生産の例

目的化合物	前駆体	前駆体から の反応数	要求する補酵素	文献
1-プロパノール	DHAP	5	3 NAD(P)H	Matsubara <i>et al.</i> , 2016
2,3-ブタンジオール	PYR	4	2 NADH	Nielsen <i>et al.</i> , 2010
イソブタノール	PYR	5	2 NADPH	Atsumi <i>et al.</i> , 2010
メバロン酸	AcCoA	3	2 NADPH	Tabata and Hashimoto, 2004
脂肪酸(C16:0)	AcCoA	7	7 ATP、14 NADPH	He <i>et al.</i> , 2014
<i>n</i> -ブタノール	AcCoA	7	ATP、2 NADH、2 NADPH	Lan <i>et al.</i> , 2013

### 1-3 有用物質生産宿主として用いられる微生物

大腸菌はグラム陰性の桿菌であり、環境中に広く分布している。大腸菌は、培養操作の簡便性および迅速に増殖することから、遺伝子工学、酵素工学、代謝工学、および合成生物学など幅広い分野において研究対象とされている。これまでに大腸菌に対して有用物質を生産させる研究は多くなされており、バイオ燃料および付加価値の高い医薬品原料などの様々な物質生産系の構築に成功している(Shen *et al.*, 2011、Martin *et al.*, 2003)。一部では工業生産化にも成功している(Wendisch *et al.*, 2006)。しかし、野生型株および遺伝子改変株の生理学的応答に関わる多くの複雑な代謝の調節機構の全容は明らかになっていないため、大腸菌を宿主とした物質生産系を構築する上で障害になりうる。

シアノバクテリアは酸素発生型の光合成を行う微生物の総称を指す。物質生産宿主としてシアノバクテリアを用いることは、石油産業などの二酸化炭素を排出する物質生産系に比べて環境負荷を低減できる。シアノバクテリアの光合成には、二酸化炭素、水、および太陽光といった環境中に豊富に存在する原料のみを要する。従って、ヒトの食糧需要と競合しないこと、ならびに大腸菌および酵母などの従属栄養生物を用いた物質生産の系に比べて培養にかかる費用が少ないことが特徴として挙げられる。また、シアノバクテリアによる光合成では、トウモロコシおよびサトウキビなどの陸上の高等植物に比べて太陽エネルギーの利用効率がよく(シアノバクテリア; 3–9%、高等植物; 0.25–3%)、優れた物質変換能力を有していると言える(Dismukes *et al.*, 2008)。さらに、遺伝子操作技術が確立されていること、および全ゲノム配列が明らかになっていることはシアノバクテリアの汎用的利用を助長している(Wang *et al.*, 2012)。現在までにシアノバクテリアによるアルコール類、テルペノイド、および糖類などの物質生産系

の構築に成功しており(Kusakabe *et al.*, 2013、Lan *et al.*, 2013、Atsumi *et al.*, 2009、Lindberg *et al.*, 2010、Ducat *et al.*, 2012)、一部の物質生産系では理論収率の92%を達成したという報告もある(Oliver and Atsumi, 2014)。しかし、大腸菌および酵母などの実用化に成功している微生物と比べて物質生産速度が数百倍程度低いという問題が残っている。シアノバクテリアの特徴である光合成能力は、光化学系と称されるタンパク質複合体が関与している(図 1-3)。光化学系は太陽エネルギーを用いて水を還元することで電子およびプロトンを獲得し、その電子を用いて NADPH および ATP 類を生産する機能を担っている。すなわち、シアノバクテリアは中心代謝経路に加えて光合成系も使って NADPH を生産できるため、大腸菌などの従属栄養生物に比べて複雑な代謝システムをもつことを意味する。従って、シアノバクテリアによる効率的な物質生産を達成するためには、光合成能力および中心代謝経路を包括的に理解し、その上で適切な代謝改変を行う必要がある。

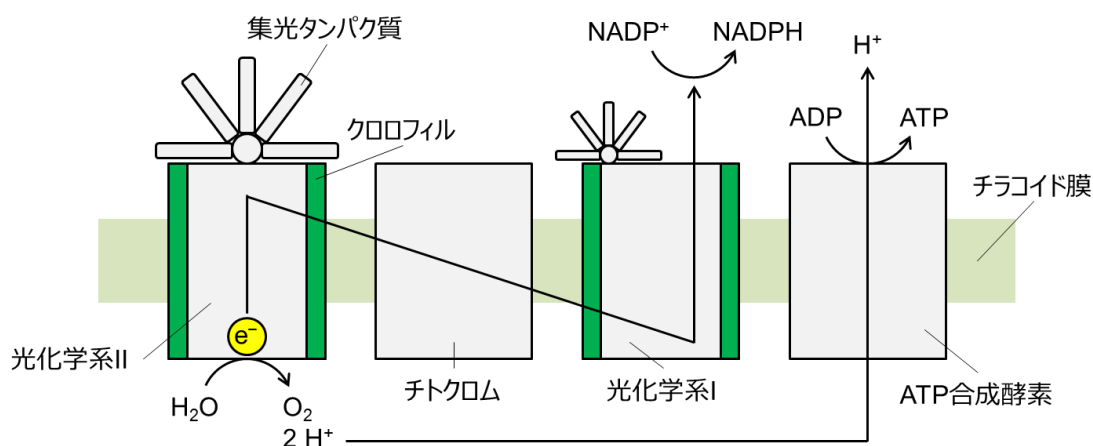


図 1-3 光化学系における補酵素生産システム

#### 1-4 $^{13}C$ 代謝フラックス解析

補酵素は中心代謝経路上の反応で生産あるいは消費されるため、生理条件における代謝反応の速度(フラックス)を明らかにすることで補酵素の再生/消費速度を定量的に理解できる。先行研究において、遺伝子発現量あるいは酵素タンパク質量などの細胞構成成分の量的変化の情報からフラックスの増減を推定する手法が開発され、フラックスの変化を間接的に推定した例が報告されている(Vucic *et al.*, 2012、Park *et al.*, 2005)。しかし、酵素活性は翻訳後修飾およびアロステリック制御などの定量が困難な因子の影響を受けること、さらに酵素遺伝子の発現量と翻訳産物であるタンパク質量の相関が低い例が報告されていることから(Chen *et al.*, 2002)、細胞構成成分の量的変化の情報からフラックスを正確かつ定量的に推定すること

の困難性が指摘されている。この問題に対し、 $^{13}\text{C}$  標識した化合物を用いた細胞標識および計算機処理を組み合わせたフラックス推定技術が開発されてきた (Stephanopoulos, 1999、Wiechert, 2001)。この手法を  $^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析 ( $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis;  $^{13}\text{C}$ -MFA) と称する。 $^{13}\text{C}$ -MFA は、対数増殖期中などの細胞内外の物質の流出入の速度が一定状態に保たれていると仮定できる状態 (代謝定常) を対象としており、化学量論式および代謝物に含まれる  $^{13}\text{C}$  標識の存在比 ( $^{13}\text{C}$  標識割合) の情報に基づいて、中心代謝経路上のフラックスの向きおよび大きさ、ならびに代謝経路上の分岐比を定量的に推定する手法である。 $^{13}\text{C}$ -MFA は ①  $^{13}\text{C}$  標識した炭素源下における細胞外化合物の生産/消費速度の測定 (物質収支の規定)、② 質量分析計を用いた各代謝物中の  $^{13}\text{C}$  標識割合の測定 (代謝経路上の分岐比の決定)、③ 計算機上に構築した代謝モデルにおける実測した  $^{13}\text{C}$  標識割合と推定した  $^{13}\text{C}$  標識割合の近似 (非線形最適化を用いた代謝経路上のフラックス分布の探索)、の 3 つの工程から構成されている。

$^{13}\text{C}$ -MFA は、細胞に取り込まれた  $^{12}\text{C}$ : $^{13}\text{C}$  の割合が時間発展しない時期における解析 (安定同位体定常解析) および時間発展を伴う時期における解析 (安定同位体非定常解析) に大別される (図 1-4)。双方とも細胞構成成分として  $^{13}\text{C}$  標識を取り込んだ代謝物を測定する点において共通しているが、対象の代謝物が異なる。安定同位体定常解析では、 $^{13}\text{C}$  標識率が一定に達した時期を解析対象としているため、 $^{13}\text{C}$  標識は細胞内代謝物全体に分布していると考えられる。従って、細胞内に豊富にあるタンパク質由来アミノ酸を測定することで、アミノ酸の前駆体である中心代謝経路上の各代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識パターンからフラックスの情報が得られる。この手法は従来の  $^{13}\text{C}$ -MFA として大腸菌および酵母などの従属栄養生物の研究で多く用いられているものの、二酸化炭素を単一炭素源とするシアノバクテリアを対象とした解析には向かない。二酸化炭素は炭素原子を 1 つしかもたないため、 $^{13}\text{C}$  標識した二酸化炭素を用いて培養した場合、与えた二酸化炭素の  $^{13}\text{C}$  標識率が最終的に全ての代謝物の標識パターンと一致するため、フラックスの情報が失われる。一方、安定同位体非定常解析では、 $^{13}\text{C}$  標識率が推移している過程 (数分間) を解析対象としているため、 $^{13}\text{C}$  標識は細胞内代謝物全体に分布していないと考えられる。特に、生合成に時間を要するタンパク質などの高分子には  $^{13}\text{C}$  標識が行き渡らないため、同位体定常解析と同様の方法ではフラックスを決定することができない。 $^{13}\text{C}$  標識の添加後、最も短期間に、かつ確実に  $^{13}\text{C}$  標識が導入されるのは、 $^{13}\text{C}$  標識された炭素源が直接変換される中心代謝経路上の中間代謝物であるため、安定同位体非定常解析では中間代謝物を対象として解析を行う。

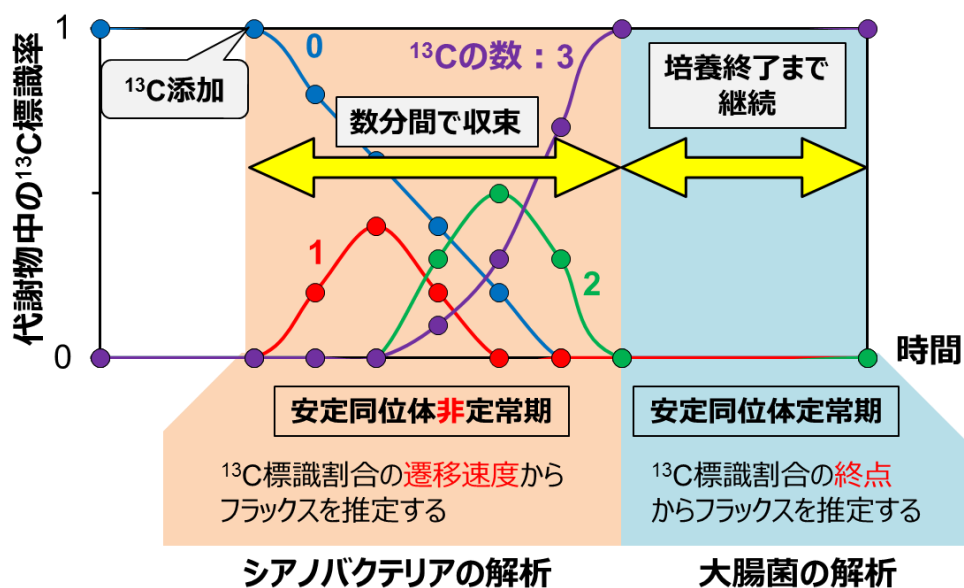


図 1-4 代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合の変化および各期における  $^{13}\text{C}$ -MFA 手法の種類

$^{13}\text{C}$ -MFA の最も強力な点の 1 つとして、フラックス分布の比較が挙げられる。異なる培養条件あるいは株間のフラックス分布を比較することで、主要な細胞内経路および代謝経路上の分岐比の違いを明らかにできる。さらに、オミクス解析技術と組み合わせることで、代謝経路の分岐点におけるフラックスの制御システムの理解 (Vallino and Stephanopoulos, 1994)、および代謝経路上の速度的あるいは制御的な律速反応の同定に成功している (Antoniewicz *et al.*, 2007c)。また、中心代謝経路上のフラックスが決まることにより、代謝反応に付随する補酵素の酸化還元速度を明らかにできる。図 1-5 のような代謝経路があった場合、グルコースから AcCoA への異化経路のうち的一方、および AcCoA の循環経路において NADPH 再生、ならびに有用物質生産反応において NADPH 消費が行われる。 $^{13}\text{C}$ -MFA によって赤字で示した各反応のフラックス値が得られる。従って、反応に付随する補酵素の酸化還元速度を得られたことになり、これらのフラックス値を積算することで細胞内全体における補酵素の再生/消費のバランスを明らかにできる。この補酵素の酸化還元バランスは細胞内において定常状態にある上、標識実験などによる直接的な追跡が難しいため、 $^{13}\text{C}$ -MFA による酸化還元バランスの定量的な議論は代謝システムを理解する上で有益な情報源になり得る。例えば、細胞に対してしかるべき改変を加えることで、NADPH 再生を伴う反応でグルコースを異化し、全て AcCoA を有用物質の生産に使う株を構築できた場合、現状の細胞よりも高い速度で有用物質を生産できるようになることがわかる。

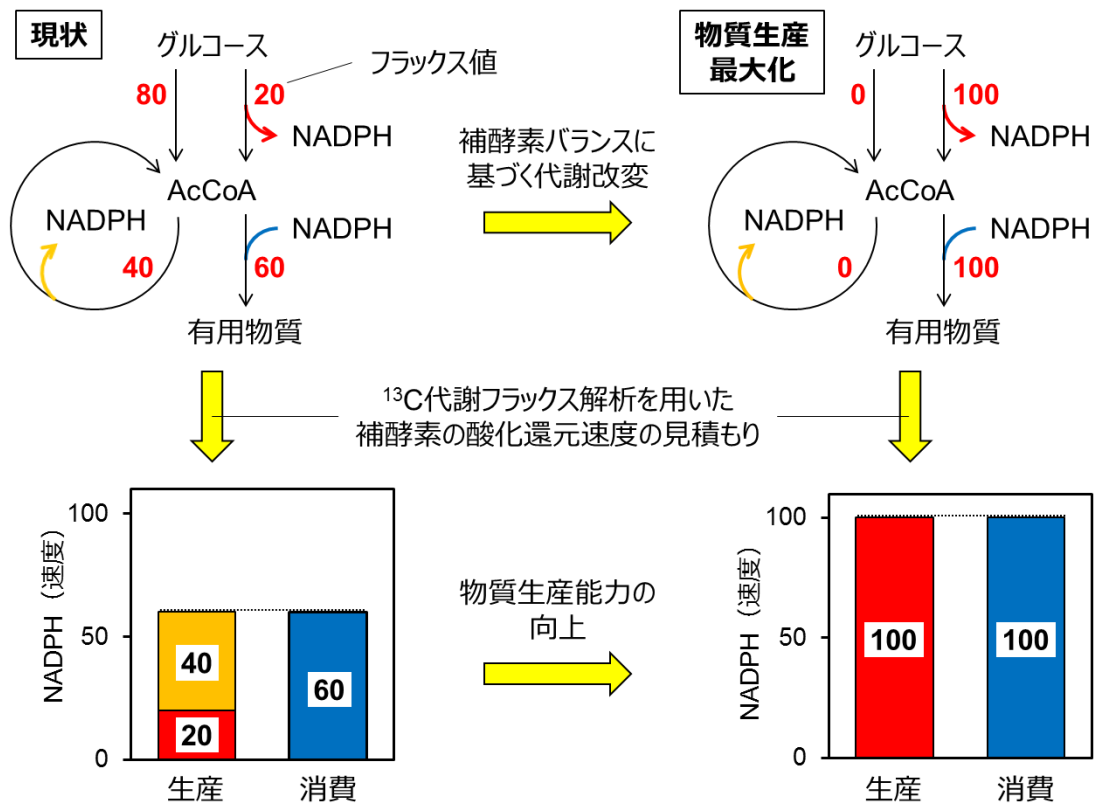


図 1-5 代謝フラックスと NADPH の再生/消費速度の関係性

ただし、<sup>13</sup>C-MFA で得られる結果は、解析点における代謝状態が反映されたフラックス分布のみであり、中心代謝経路上の反応による NADPH の再生/消費の収支は明らかにできるものの、その代謝状態に至った経緯あるいは原因に関する情報は含まれない。これらの示唆を得るためには、解析対象株の評価に適したコントロールを立てる必要がある(例; 有用物質生産能力の有無、特定の機能の有無など)。これに対し、*in silico* 代謝シミュレーションでは、目的生産物質を最大化するためのフラックス分布が求められるため、両者を比較することで、対象の細胞が抱える現状の代謝の問題点を特定できる。また、代謝状態は細胞内の構成成分の量的変化にも反映されるため、それらの定量的な理解は代謝状態に至った経緯あるいは原因の究明につながる。これに対し、酵素タンパク質の一斉定量では、代謝反応を触媒する酵素の量を定量できるため、比較対象株間で生じたフラックス分布の変化の原因を特定することができる。酸素発生速度測定では、シアノバクテリア特有の機構である光化学系の活性量を定量できるため、光化学系による NADPH 再生速度の見積もりに利用できる。これらの解析技術を <sup>13</sup>C-MFA と組み合わせることで、<sup>13</sup>C-MFA 単体では得られなかった、微生物の NADPH 再生/消費の収支に関する情報を、より深く議論できるようになると考えられる。

## 1-5 本博士論文の対象

本研究で扱う微生物および有用物質を示した(図 1-6)。微生物を栄養学的に分類すると、細胞外から有機化合物を取り込む従属栄養微生物、および無機化合物を取り込む独立栄養生物に大別される(図 1-6A)。従属栄養微生物はグルコースなどの単糖のほか、グリセロールといったアルコール類を炭素源にできる。本研究では、デンプン、グリコーゲン、およびセルロースなどの基本構成単位として自然界に最も多く存在し、多くの微生物が資化できるグルコースを炭素源の対象とした。独立栄養生物は、二酸化炭素などの気体、メタノールおよびギ酸などの炭素数が 1 の化合物を炭素源にできる。本研究では、単一炭素源として物質生産系が構築された例があり、炭素の循環的な利用による環境負荷の少ない物質生産のできる二酸化炭素を炭素源の対象とした。

これまでに構築された目的化合物生産系の酸素条件の違いを示した(図 1-6B)。一般に、好気条件ではグルコースなどの炭素源を完全に酸化することができ、その際に多くのエネルギーを生産できるため、増殖速度が大きく、物質生産に必要な還元力を確保することができる。また嫌気条件とは異なり、発酵による副生産物の生合成を防げるため、目的化合物の生合成に炭素源をより多く分配できる。さらに、メバロン酸(MVA)および *n*-ブタノール(BuOH)の生産には生合成の際にNADPHを要する。NADPHは中心代謝経路上の限られた反応で生産されるため、これらの化合物を生合成することは、代謝系に摂動を与えると考えられる。

これまでに構築された各微生物による物質生産系の生育条件および炭素源の違いを示した(図 1-6C)。大腸菌はグルコースを炭素源とする従属栄養生物であり、これまでに好気条件および嫌気条件による物質生産系が構築されており、一部は実用化に至っている(Wendisch *et al.*, 2006)。シアノバクテリアは二酸化炭素を炭素源とする独立栄養生物であり、好気条件による物質生産系が構築されており、次世代の物質生産宿主として期待されている。

そこで、本学位論文では、異なる炭素源および NADPH を用いた物質生産の代表例として、大腸菌およびシアノバクテリアによるメバロン酸(MVA)および *n*-ブタノール(BuOH)生産中の代謝状態の解析を対象とし、各微生物のフラックス分布の特徴の解明および物質生産中の代謝上の問題点の解明を目的とした。両生物種によるこれらの化合物の物質生産系は既に構築されており、対数増殖期中の生産速度が大きいことが知られている。また両化合物の生合成には、中心代謝経路上において還元する反応が限られている NADPH を消費する。従って、これらの化合物を生産することは炭素の変換効率および NADPH の再生/消費速度の観点から代謝に摂動を与えていると考えられる。そこで、<sup>13</sup>C-MFA を用いて酸化還元速度のバランスを明らかにし、物質生産中の代謝状態の解明を通して負担がかかっている代謝反応の特定を目指した。

また、シアノバクテリアは中心代謝経路の他に、光化学系を用いて NADPH を生産する。そのため大腸菌に比べて NADPH の酸化還元に関する代謝システムが複雑であり、シアノバクテリアを用いた効率的な物質生産系の構築に向けて補酵素の酸化還元に関わる代謝システムを理解する必要がある。そこで、NADPH の消費に関わる遺伝子の破壊株を構築し、<sup>13</sup>C-MFA を用いて明らかにした酸化還元速度のバランスから、遺伝子破壊株で生じた代謝上の問題点の特定を目指した。

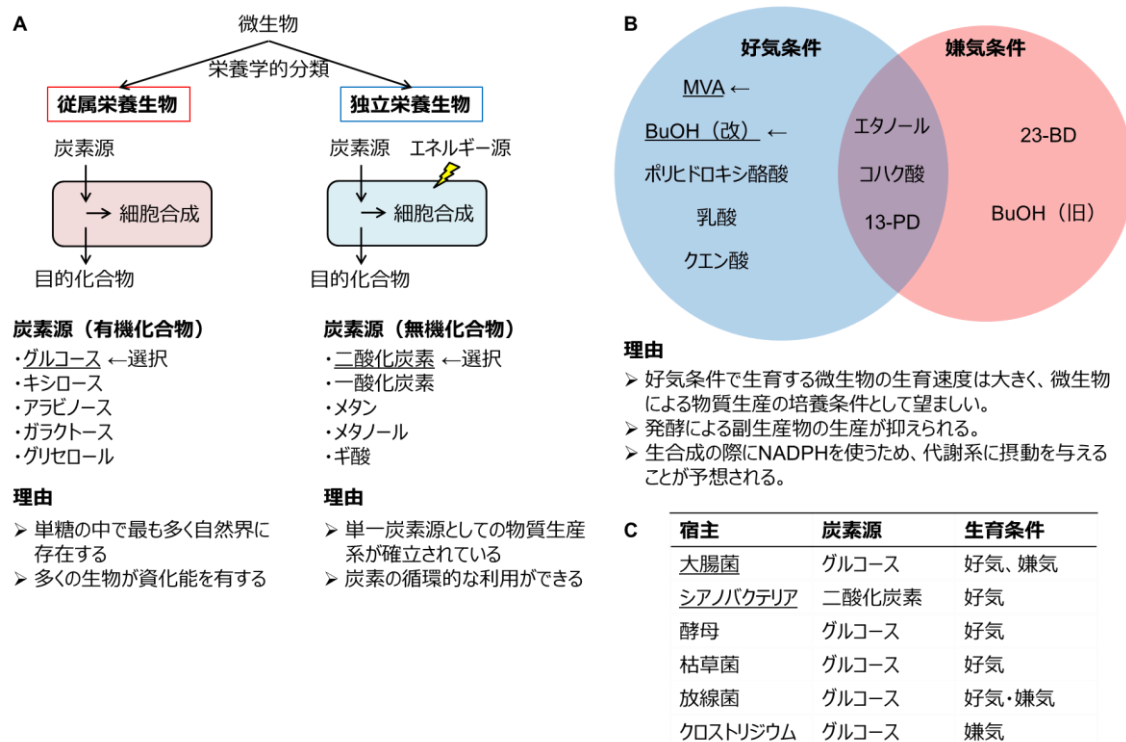


図 1-6 本研究の対象微生物および有用物質の選択

(A) 微生物の栄養学的分類。各形態の微生物が要求する炭素源の例を挙げ、本研究の対象とする炭素源および選択した理由を述べた。(B) 目的化合物ごとの酸素条件の違い。これまでに構築された目的化合物生産系で用いられた酸素条件を分類し、本研究の対象とする化合物および選択した理由を述べた。MVA、BuOH、13-PD、および 23-BD はそれぞれメバロン酸、*n*-ブタノール、1,3-プロパンジオール、および 2,3-ブタンジオールを示す。BuOH 生産は、遺伝子改変によって酸素存在下でも生産できるようになったものを“改” (Lan *et al.*, 2013)、遺伝子改変前を“旧”とした。(C) 有用物質生産宿主の例。これまでに構築された物質生産宿主の例を挙げ、炭素源および生育条件が適合する微生物を本研究の対象とした。

## 1-6 本博士論文の構成

本学位論文では、有用物質を効率的に生産する微生物を創出する上で有効な、代謝系の設計原理に関する情報の抽出を目的とし、栄養条件の異なる微生物による有用物質生産中の代謝状態、およびシアノバクテリアの光化学系による NADPH の再生/消費速度への寄与を例に挙げた。さらに、これらの結果を総括し、フラックス分布および NADPH 再生/消費速度に基づいた細胞評価方法が有効であることを示した。

本学位論文は全5章より構成される(図 1-7)。

第1章では、本研究の背景および目的、ならびに本論文の構成について記述した。

第2章では、<sup>13</sup>C 標識したグルコースを用いた代謝フラックス解析法を用いて、従属栄養条件下における MVA 生産大腸菌の代謝状態を明らかにした。MVA の生産には NADPH を還元力として要するため、中心代謝経路上で NADPH を生産する PP 経路のフラックスが向上することが予想されたが、非生産株のフラックス分布との間に差は見られなかった。フラックス分布に基づいて補酵素の酸化還元速度のバランスを評価したところ、MVA の生合成に必要な NADPH はトランスヒドロゲナーゼによって生産されることを明らかにした。当章では、計算機上の代謝シミュレーション解析を組み合わせた。シミュレーションで求めた、理論最大効率で MVA を生産する際のフラックス分布と現状のフラックス分布を比較したところ、PP 経路および TCA 回路の遮断し、かつトランスヒドロゲナーゼのみで NADPH を生産することで MVA 生産効率を最大化できることを明らかにした(図 1-7、第2章)。

第3章では、<sup>13</sup>C 標識した二酸化炭素を用いた代謝フラックス解析法を用いて、光独立栄養条件下における BuOH 生産シアノバクテリアの代謝状態を明らかにした。BuOH 生産株は非生産株に比べて増殖速度が低下しており、二酸化炭素固定速度の低下との因果関係が見出された。また、両株共に固定した二酸化炭素を排出する PP 経路の利用率が高く、細胞合成効率が低いことを明らかにした。フラックス分布に基づいて補酵素の酸化還元速度のバランスを評価したところ、BuOH 生合成による NADPH 消費は極めて微弱であること、および生産株では光化学系による NADPH 再生速度が低下したことを明らかにした。当章では、プロテオーム解析および酸素発生速度の測定実験を組み合わせた。その結果、光化学系のタンパク質複合体の量および光化学系の活性を表す酸素発生速度が低下していたことから、生産した BuOH によって光化学系のタンパク質が減少したことを明らかにした。これらの結果から、生産株の BuOH 生産効率を向上させるため、PP 経路の遮断および光化学系のタンパク質複合体の発現強化が有効であることが示された(図 1-7、第3章)。

第4章では、NADPH の消費に関わる呼吸鎖遺伝子の破壊株が中心代謝経路および光化学系の NADPH の再生/消費の収支に与える影響を明らかにするため、<sup>13</sup>C 標識したグルコー

スを用いた代謝フラックス解析、および酸素発生速度測定を行った。遺伝子破壊株は親株に比べて増殖速度が低下したが、光化学系の活性を表す酸素発生速度および NADPH 再生速度は向上していた。これは、NADPH 消費に関わる呼吸鎖遺伝子の破壊株では NADPH の再生速度が高いことを意味する。呼吸鎖遺伝子破壊株では余剰な NADPH の生産速度を低下させるため、直線的電子伝達系を用いた電子の伝達率を低下させていると考えられる。電子伝達速度は実験による定量的な測定が困難であるが、<sup>13</sup>C-MFA および酸素発生速度の測定を組み合わせることで、直線的電子伝達経路の定量的な理解に貢献した(図 1-7、第4章)。

第5章では、本研究の結果を総括し、NADPH の酸化還元バランスに基づいた代謝システムの評価の有効性、および <sup>13</sup>C-MFA の周辺技術との結合性を議論し、結言とした(図 1-7、第5章)。

以降の章において、各名称は巻末に記載した略語を用いて表現する。

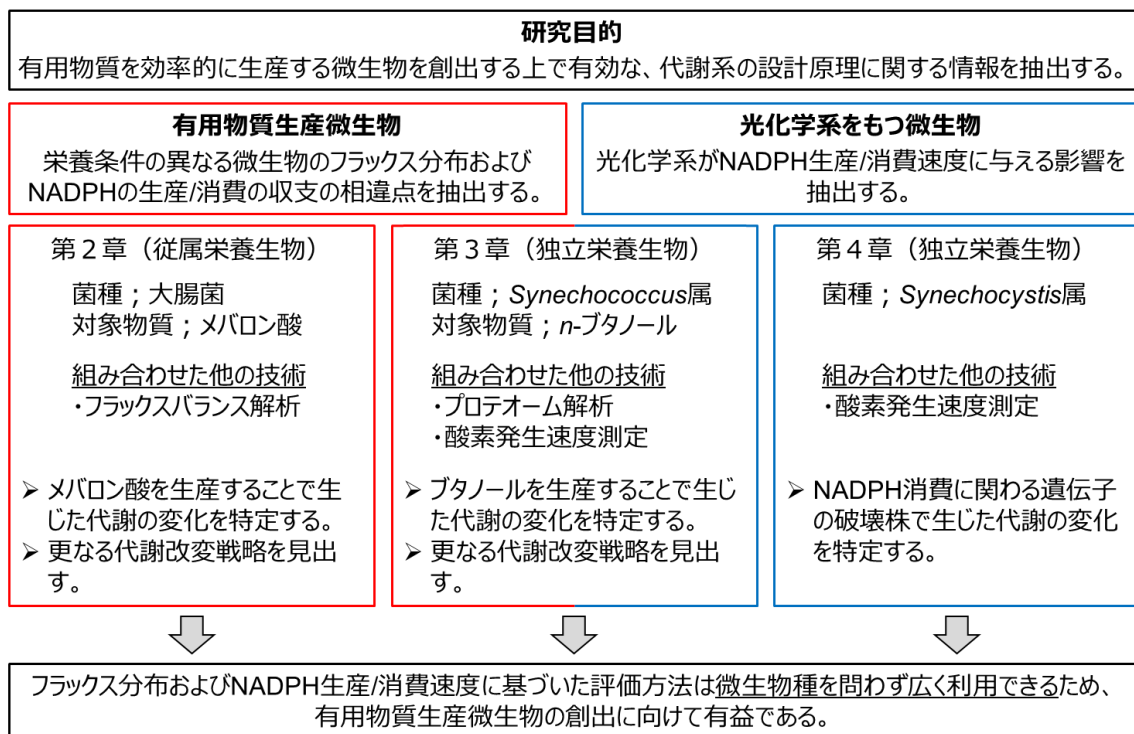


図 1-7 本論文の概要

## 第2章 メバロン酸を生産する大腸菌の代謝解析

### 2-1 緒言

第1章において、本論文の解析対象とする有用物質生産宿主および目的化合物を定義した。第2章では、従属栄養生物、かつ目的化合物の生合成に NADPH を要する、大腸菌によるメバロン酸生産の例を挙げ、物質生産中の大腸菌の代謝状態の解析を通して、物質生産の効率化に向けて有効な代謝改変箇所の特定を目指した。

大腸菌はグラム陰性の桿菌であり、外界からグルコースなどの有機化合物を取り込むことで生育および物質生産する。大腸菌は迅速に生育すること、および操作が簡便なことから遺伝子工学、酵素工学、代謝工学、および合成生物学など、他分野で研究されている。既に大腸菌を用いた物質生産系は数多く構築されており、実用化されている例も報告されている (Wendisch *et al.*, 2006)。しかし、複雑な代謝制御機構の一部のみしか明らかになっておらず、このことは大腸菌を宿主とした物質生産にとって障害になりうる。

メバロン酸 (MVA) は薬、化粧品、および食品添加物の前駆体として有用な物質であり、微生物による物質生産が試みられている (Martin *et al.*, 2003, Haratake *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2003, Yoon *et al.*, 2009)。MVA は中心代謝経路上の AcCoA から合成され、その後イソプレノイドの構成要素であるイソペンテニル二リン酸 (IPP) およびジメチルアリル二リン酸 (DMAPP) に生合成される。これまでに MVA を高生産する微生物はスクリーニングによって単離されており、*Saccharomyces fibuliger* ADK8107 において 12 日間で 19 g/L の MVA が合成されたことが報告されている。しかし、酵母は細胞合成のために MVA からイソプレノールの生合成を行うため、MVA 収量の低下が懸念されている。これに対し、大腸菌は本来 MVA 生合成遺伝子をもたず、別の経路を使って細胞合成に必要な IPP および DMAPP を生産するため、生産した MVA の消費を考慮する必要がない (Tabata and Hashimoto, 2004)。先行研究において、大腸菌に *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, あるいは *Enterococcus faecalis* 由来の MVA 生合成遺伝子を導入し、MVA 生産能を付加させることに成功している (Martin *et al.*, 2003, Yoon *et al.*, 2003, Tabata and Hashimoto, 2004, Zheng *et al.*, 2013)。特に Tabata らの行った、大腸菌に *E. faecalis* 由来の MVA 生合成遺伝子を導入した株を流加培養した実験では、現在報告されている中で最も高い 2 日間で 47 g/L の MVA 生産に成功している。MVA の生合成には還元力として補酵素 NADPH を利用した、中心代謝経路上の中間体代謝物 AcCoA の重合過程が存在する。また、中心代謝経路中には NADPH の主要な生産反応を含んでいる。従って、MVA を生産することは炭素利用効率や NADPH 収支の観点から中心代謝経路の

代謝フラックスに直接影響を与えていると考えられる。MVA の高生産化に向けてはこれらを理想的な代謝状態に導くことが望まれているものの、現状ではMVAを生産する大腸菌の代謝状態は明らかになっていない。

本研究では、新たに作製した *E. faecalis* 由来の MVA 生合成遺伝子を導入した大腸菌を対象に、MVA 生産による代謝状態の変化について  $^{13}\text{C}$ -MFA を用いて調査した。 $^{13}\text{C}$ -MFA は物質収支制約および安定同位体標識実験に基づいて中心代謝経路上の代謝フラックスを推定する手法であり (Wiechert, 2001、Wittmann, 2007)、本研究では大腸菌および酵母などの従属栄養生物の先行研究例のある、安定同位体定常解析を採用した (図 2-1)。本手法は  $^{12}\text{C}$ : $^{13}\text{C}$  の割合が時間発展しない時期の細胞を対象としており、 $^{13}\text{C}$  標識は細胞内代謝物全体に分布していると考えられるため、細胞内に豊富にあるタンパク質由来アミノ酸を測定することで、アミノ酸の前駆体である中心代謝経路上の各代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識パターンからフラックスの情報が得られる。補酵素の酸化還元速度は代謝経路上のフラックス値に依存するため、推定したフラックス分布から NADPH の酸化還元速度のバランスを算出できる。そこで本研究では、フラックス分布および NADPH の酸化還元バランスの情報から MVA の生合成に必要な NADPH の主な生産箇所の解明を目指した。また、 $^{13}\text{C}$ -MFA の結果および *in silico* 代謝シミュレーションの結果を比較し、MVA の効率的な生産に有効な代謝改変箇所の特定を目指した。

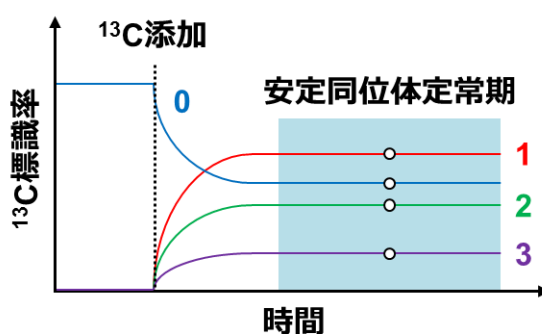


図 2-1 本章で扱う  $^{13}\text{C}$ -MFA の種類

炭素数 3 の代謝物に  $^{13}\text{C}$  標識した炭素が取り込まれる過程。 $^{13}\text{C}$  を添加した直後から代謝物に  $^{13}\text{C}$  が取り込まれはじめ、一定時間経過後には安定同位体の存在比が定常に達する。安定同位体定常解析では、 $^{13}\text{C}$  標識率が一定に達した点 (水色領域) でフラックス分布を推定するため、この期間にサンプリングを行う。色つきの数字は代謝物中の  $^{13}\text{C}$  の数を示す。

## 2-2 実験材料および実験方法

### 2-2-1 培地組成および使用菌株

前々培養には LB 培地(天然培地;5 g/L 酵母抽出物、10 g/L トリプトン、5 g/L 食塩)、前培養および本培養には改変 M9 培地(合成培地;17 g/L リン酸水素二ナトリウム・12 水和物、3.1 g/L リン酸二水素カリウム、1 g/L 塩化アンモニウム、0.5 g/L 食塩、0.25 g/L 硫酸マグネシウム・7 水和物、15 mg/L 塩化カルシウム・2 水和物、8.1 g/L 塩化鉄(III)、1 mg/L 硫酸マンガン(II)・4 水和物、1.7 mg/L 塩化亜鉛、0.43 mg/L 塩化銅(II)・2 水和物、0.6 mg/L 塩化コバルト(II)・6 水和物、0.6 mg/L モリブデン酸ナトリウム・2 水和物、および 4 g/L グルコース;pH 7.5)を用いた。固体培地は 15 g/L 寒天を含む。必要に応じて、カナマイシンおよびイソプロピル- $\beta$ -チオガラクトピラノシド(IPTG)をそれぞれ 30 mg/L および 24 mg/L になるように添加した。

本研究では、物質生産宿主として *E. coli* K12 MG1655(DE3)派生の株を用いた(Tokuyama *et al.*, 2014)。DNA 操作には *E. coli* DH5 $\alpha$  株を用いた。MVA 生産用遺伝子保持用のベクターとして pCOLADuet-1 (Km<sup>R</sup>、T7 プロモーター;Merck KGaA)を使用した。2 種類の MVA 生産用遺伝子(*mvaE*;アセトアセチル CoA 合成酵素遺伝子/3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA 還元酵素遺伝子、*mvaS*;3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA 合成酵素遺伝子)は、*E. faecalis* の DNA 配列を基準とし、GeneArt (Thermo Fischer Scientific)で大腸菌用にコドン使用頻度を最適化したものを使用した。遺伝子および pCOLADuet-1 を *Nde*I および *Xho*I サイトで処理し、サブクローニングした(pCOLADuet-1/*mvaES*; 図 2-2)。pCOLADuet-1 および pCOLADuet-1/*mvaES*を用いて *E. coli* K12 MG1655(DE3)を形質転換し、それぞれ MVA 非生産(コントロール)株および MVA 生産(改変)株を構築した。改変株は IPTG を添加することで *mvaES* 遺伝子の発現が誘導され、それに伴い MVA が生産される。

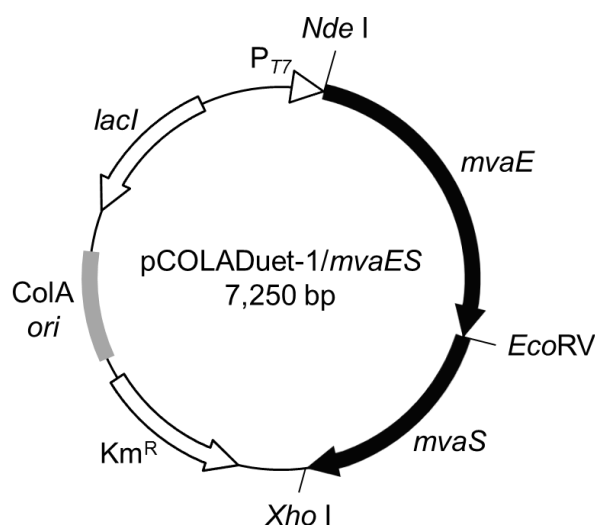


図 2-2 pCOLADuet-1/*mvaES* の構造

### 2-2-2 細胞濁度および乾燥菌体重量測定

経時的に培養液を回収し、分光光度計 (UVmini-1240; Shimadzu) を用いて、培養液の 600 nm における濁度 ( $OD_{600}$ ) を測定した。乾燥菌体重量を測定するため、 $OD_{600} = 1$  の培養液 25 mL をろ過し、0.9% 食塩水を用いて洗浄した後、フィルターごと  $70^{\circ}\text{C}$  で十分乾燥させた。乾燥したフィルターの重量を測定し、乾燥菌体重量 ( $\text{gDCW/L}/OD_{600}$ ) を算出した。

### 2-2-3 培養条件

冷凍保存菌体を LB 固体培地に塗布後  $37^{\circ}\text{C}$  で一晩培養し、コロニーを単離した。前々培養として、LB 培地 5 mL を入れた試験管にシングルコロニーを植菌し、 $37^{\circ}\text{C}$  で一晩振とう培養した。前培養として、50 mL の改変 M9 培地を入れた 200 mL 羽根つきフラスコに初期  $OD_{600} = 0.05$  になるように前々培養液を植菌し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 24 時間振とう培養した。本培養として、前培養液を前培養と同様の条件の羽根つきフラスコに初期  $OD_{600} = 0.05$  になるように植菌し、 $^{13}\text{C}$  標識実験を行った。 $OD_{600} \approx 0.5$  の時に IPTG を添加し、MVA 生合成遺伝子を発現誘導した (培養開始から約 4 時間後)。

### 2-2-4 培地成分の測定

経時的に培養液を回収し、 $18,000 \times g$ 、5 分間、 $4^{\circ}\text{C}$  で遠心分離した。上清は  $0.45 \mu\text{m}$  のフィルター (Millex HV; Merck KGaA) でろ過し、使用するまで  $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。UV-vis 検出器および屈折率検出器を搭載した高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography, HPLC Prominence; Shimadzu) を用いて、培養液中のグルコース、ピルビン酸、

乳酸、酢酸、ギ酸、エタノール、およびコハク酸濃度を測定した。等量の培養液および内部標準液(5 mM イソ酪酸溶液)を混合し、分析に供した(表 2-1)。

表 2-1 HPLC の分析条件

装置	HPLC Prominence (Shimadzu)
カラム	Aminex HPX-87X (BioRad)
検出器	紫外・可視分光検出器 (SPD-20A)、屈折率検出器 (RID-10A)
温度	65°C
溶離液	1.5 mM 硫酸
流速	0.5 ml/分
注入量	20 $\mu$ L

### 2-2-5 GC-MS による $^{13}\text{C}$ 標識割合の測定

培養開始後 5 時間目および 6 時間目(それぞれ  $\text{OD}_{600} \approx 1$  および 1.5)の培養液を 7.5 mL 回収し、 $10,000 \times g$ 、5 分間、4°C で遠心分離した。さらに 0.9% 食塩水を用いて菌体ペレットを再懸濁し、同条件で再度遠心分離して菌体を洗浄した。この操作を 2 回繰り返したのち、使用するまで -30°C で保存した。

保存した菌体ペレットに 6 N 塩酸で再懸濁し、ガラスチューブに移し替え、ヒートブロック恒温槽 (Dry Thermo Unit TU-1C; TAITEC) で 105°C、18 時間加熱した。その後、加水分解液をフィルターろ過し、-30°C で保存した。加水分解液を 1.5 mL チューブに移し、SpeedVac SPD1010 (Thermo Fischer Scientific) を用いて 60°C で減圧乾固した。その後、50  $\mu$ L アセトニトリルおよび 50  $\mu$ L *N*-メチル-*N*-(*tert*-ブチルジメチルシリル)トリフルオロアセトアミド + 1% *tert*-ブチルジメチルクロロシラン (MTBSTFA + 1% *tert*-TBDMS) を加え、99°C で 60 分間処理した後、室温で 60 分間クーリングし、 $18,000 \times g$ 、5 分間、4°C で遠心して上清をシングル四重極型ガスクロマトグラフ-質量分析計 (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) に供した(表 2-2)。電子イオン化の際に生じるフラグメントイオン [M-57]<sup>+</sup>, [M-85]<sup>+</sup>, [M-159]<sup>+</sup>, [f302]<sup>+</sup> を測定対象とした。アミノ酸の官能基は以下に示したような修飾を受ける(図 2-3)。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図 2-4 のように断片化が起きる。

表 2-2 GC-MS の分析条件

装置	Agilent 7890 GC、Agilent 5975 MSD (Agilent Technologies)
カラム	DB-5MS + DG (Agilent Technologies)
注入口温度	250°C
注入方法	スプリットモード (10:1)
注入量	1 μL
キャリアガス	ヘリウム
流量	1 mL/分
昇温条件	150°C (2 分) ~ +3°C/分 (40 分) ~ +10°C/分 (3 分) ~ 300°C (5 分)
Aux2/四重極温度	230°C/150°C
イオン化法	電子イオン化
イオン化電圧	70 eV
分析モード	選択イオンモニタリングモード

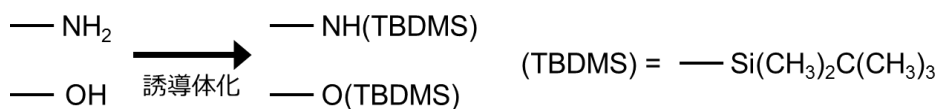


図 2-3 MTBSTFA + 1% *tert*-TBDMS による誘導體化

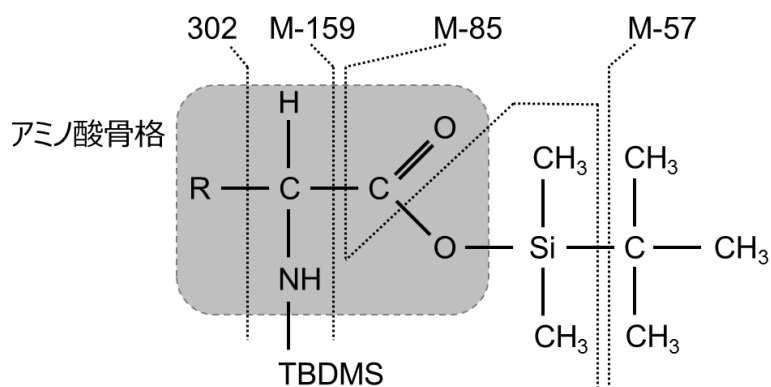


図 2-4 TBDMS 化したアミノ酸のイオン断片のパターン

### 2-2-6 安定同位体定常状態における $^{13}\text{C}$ -MFA

$^{13}\text{C}$ -MFA に利用する質量分析データのハンドリング、代謝モデルの構築、実験で得られた各代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合を説明するフラックス分布の推定、および各フラックスの 95% 信頼区

間の算出には OpenMebius (Kajihata *et al.*, 2014) を用いた。各代謝物の質量同位体分子種の分布 (Mass Isotopomer Distribution; MID) の経時データは GC-MS で分析した。代謝物質中に天然の割合で存在する炭素、水素、酸素、窒素、およびケイ素の同位体の影響は先行研究の方法に従って除去した (van Winden *et al.*, 2002)。培養開始から 5–6 時間目の間の累積  $^{13}\text{C}$  標識割合は式 1 に従って計算した。 $MID_{x\text{h}}$  は x 時間目の  $^{13}\text{C}$  標識割合を、 $OD_{x\text{h}}$  は x 時間目の細胞濁度を示す (式 2-1)。

$$MID_{5-6\text{h}} = \frac{MID_{6\text{h}} \times OD_{6\text{h}} - MID_{5\text{h}} \times OD_{5\text{h}}}{OD_{6\text{h}} - OD_{5\text{h}}} \quad (\text{式 2-1})$$

大腸菌の中心代謝経路モデルには、EMP 経路、PP 経路、ED 経路、グリオキシル酸経路、TCA 回路、補充経路、C1 代謝、および MVA 生合成経路が含まれる (付録表 2-1)。増殖のために必要な細胞構成成分の前駆体の要求フラックスは乾燥菌体量当たりの前駆体量の文献値に比増殖速度の実験値を乗じて算出した (Ingraham *et al.*, 1983)。MID の標準偏差は 0.01 とした。各代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合は Elementary Metabolite Unit (EMU) を用いて計算した (Antoniewicz *et al.*, 2007b)。MATLAB が提供する非線形最適化ソルバー *fmincon* を利用し、式 2 の目的関数が最小となるフラックス分布を探索した (式 2-2)。

$$RSS = \sum_{\text{metabolite}} \left\{ \sum_{i=0}^n \{MID_{\text{exp}}(M+i) - MID_{\text{sim}}(M+i)\}^2 \right\} \quad (\text{式 2-2})$$

フラックスの 95% 信頼区間は F 分布を用いたグリッドサーチ法によって算出した (van Winden *et al.*, 2005, Antoniewicz *et al.*, 2006)。フラックスの 95% 信頼区間を与える残差二乗和 RSS の許容範囲は以下の式 2-3 で与えられる。

$$RSS(v) \leq RSS(v_{\text{opt}}) + \frac{RSS(v_{\text{opt}})}{n-p} \cdot F_{\alpha}(1, n-p) \quad (\text{式 2-3})$$

### 2-2-7 フラックスバランス解析

フラックスバランス解析 (FBA) とは、ゲノムスケール代謝モデルを用いて、①細胞内代謝が定常であること、②各代謝フラックスの上限値と下限値を制限すること、③細胞増殖を最大化すること、を制約条件とし、細胞の代謝フラックス分布を計算する代謝シミュレーション手法の一つである (Orth *et al.*, 2010)。全ての計算は MATLAB および Cobra Toolbox の最適化ソルバー Linear Programming および GNU Linear Programming Kit を使用した (Becker *et al.*, 2007)。代謝モデルとして、*ecoli\_core\_model* に MVA 生合成経路を追加したモデルを使用した (King *et al.*, 2015)。コントロール株および改変株のグルコース取込速度は、それぞれ 7.74 および

8.21 mmol/gDCW/h に設定した。両株の増殖非連動型の細胞維持用 ATP 消費速度は 8.39 mmol/gDCW/h に設定した (Feist *et al.*, 2007)。

バイオマス収率および MVA 生産収率の関係を描画するため、増殖速度の最大化を目的関数とした。次に、最大増殖速度の値を 100 分割し、MVA 生産の最大化および最小化を目的関数として各増殖速度における最大および最小 MVA 生産速度を算出した。バイオマスおよび MVA の収率は、それぞれの固有計数 (バイオマス ; 63.1 C-mol/gDCW、MVA ; 6 C-mol/mol-MVA) を用いて変換した。理想的な MVA 生産収率時のフラックス分布の算出では、MVA 生産速度の最大化を目的関数とした。内部フラックスのユークリッドノルムを最小にするため、追加変数 `optimizeCbModel` の値を”one”に設定した。グルコース取込速度は改変株の値 (8.21 mmol/gDCW/h) を使用した。

## 2-2-8 リンゴ酸酵素の活性測定

培養開始後 6 時間目の培養液を 10 mL を回収し、10,000 × g、5 分間、4°C で遠心分離した。さらに 0.9% 食塩水を用いて菌体ペレットを再懸濁し、同条件で再度遠心分離して菌体を洗浄した。この操作を 2 回繰り返したのち、使用するまで -30°C で保存した。

菌体ペレットは 50 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で再懸濁し、氷上で超音波破碎し、18,000 × g、5 分間、4°C で遠心して上清を粗酵素抽出液とした。タンパク質濃度はブラッドフォード法を用いて定量した。粗酵素抽出液に含まれる 2 種類のリンゴ酸酵素 (*sfcA*; NAD<sup>+</sup>型、*maeB*; NADP<sup>+</sup>型) による L-リンゴ酸の酸化的脱炭酸反応を分光光度計 (UVmini-1240; Shimadzu) を用いて観察した。標準反応液として、50 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、10 mM あるいは 1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM NAD<sup>+</sup>あるいは NADP<sup>+</sup>、および 10 mM あるいは 40 mM の L-リンゴ酸を最終容量 1 mL になるように調整した。反応は粗酵素抽出液の添加を持って開始され、外気を 30°C に保ちつつ 340 nm の吸光度の変化を観察した。1 ユニットの酵素は 1 分間に 1 μmol の NAD(P)H を生産する量として定義した。吸光係数は 6.22 1/mM として計算した。

## 2-3 結果および考察

### 2-3-1 MVA 生産大腸菌 (改変株) の生育特性

MVA 非生産 (コントロール ; pCOLADuet-1 をもつ) 株および MVA 生産 (改変 ; pCOLADuet-1/*mvaES* をもつ) 株を構築し、両株の代謝の違いを明らかにした。MVA 生合成遺伝子 *mvaES* は大腸菌用にコドンが最適化されており、IPTG の添加によって遺伝子の発現を誘導できる。両株は、グルコースを単一炭素源とし、好氣的に回分培養し、培養開始から 4 時

間後 ( $OD_{600} \approx 0.5$ ) に IPTG を添加した。両株の細胞増殖および代謝物濃度を図 2-5 に、生育特性(比増殖速度、比グルコース取込速度、比酢酸生産速度、比コハク酸生産速度、および比 MVA 生産速度; 培養開始後 4–6.5 時間) 値を表 2-3 に示した。

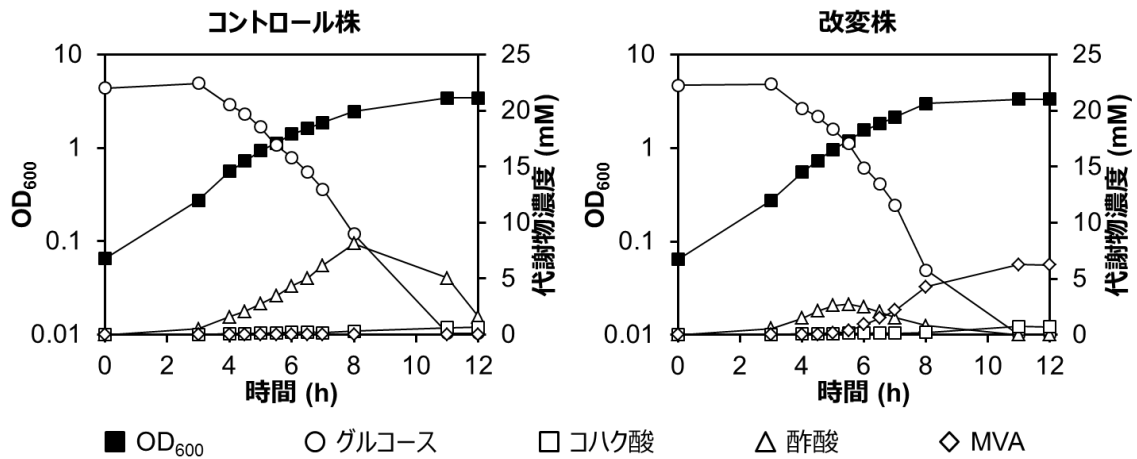


図 2-5 コントロール株および改変株の生育特性

[1-<sup>13</sup>C]グルコースを単一炭素源とする培地において好気条件で回分培養した。データは  $N = 3$  の (平均) ± (標準偏差) を示す。■ は細胞濁度、○ はグルコース濃度、△ は酢酸濃度、□ はコハク酸濃度、◇ は MVA 濃度を示す。

表 2-3 コントロール株および改変株の各種比速度

株名	比増殖速度 1/h	比速度 (mmol/gDCW/h)				収率 (C-mol/C-mol)
		グルコース消費	酢酸生産	コハク酸生産	MVA 生産	MVA
コントロール株	0.43 ± 0.01	7.74 ± 0.17	4.41 ± 0.08	0.20 ± 0.00	N.D.	N.D.
改変株	0.48 ± 0.01	8.21 ± 0.22	0.42 ± 0.24	0.08 ± 0.04	1.84 ± 0.07	0.22 ± 0.00

培養開始後 4–6.5 時間の間の比速度を算出した。データは N = 3 の (平均 ± 標準偏差) を示す。N.D. は検出不能を示す。

両株ともグルコースを消費して酢酸、コハク酸、および MVA を生産し、他の代謝物は HPLC 分析で検出されなかった。改変株の増殖速度およびグルコース取込速度はコントロール株よりも若干大きく、酢酸生産速度はコントロール株の 10% 程度であった。また、コントロール株では MVA 生産は見られなかったが、改変株では 1.84 mmol/gDCW/h (炭素収率 22% MVA C-mol/グルコース C-mol) の生産が見られた。

### 2-3-2 物質収支に基づく MVA 生産の評価

1 分子の MVA は 3 分子の AcCoA および 2 分子の NADPH を用いて合成される。AcCoA および NADPH は細胞合成に必要な物質であるため、MVA 炭素収率はバイオマス炭素収率と競合関係にあると言える。MVA 炭素収率およびバイオマス炭素収率は実測値および *ecoli\_core\_model* の物質収支式に従って算出した。MVA 炭素収率およびバイオマス炭素収率の関係性を明らかにするため、各増殖速度の最大および最小 MVA 生産速度を算出し、炭素収率に変換した。変換した各炭素収率の点を結んだ線内の灰色領域は細胞のとりうる代謝状態を示しており(図 2-6)、コントロール株および改変株の実験データを図上に表記した。

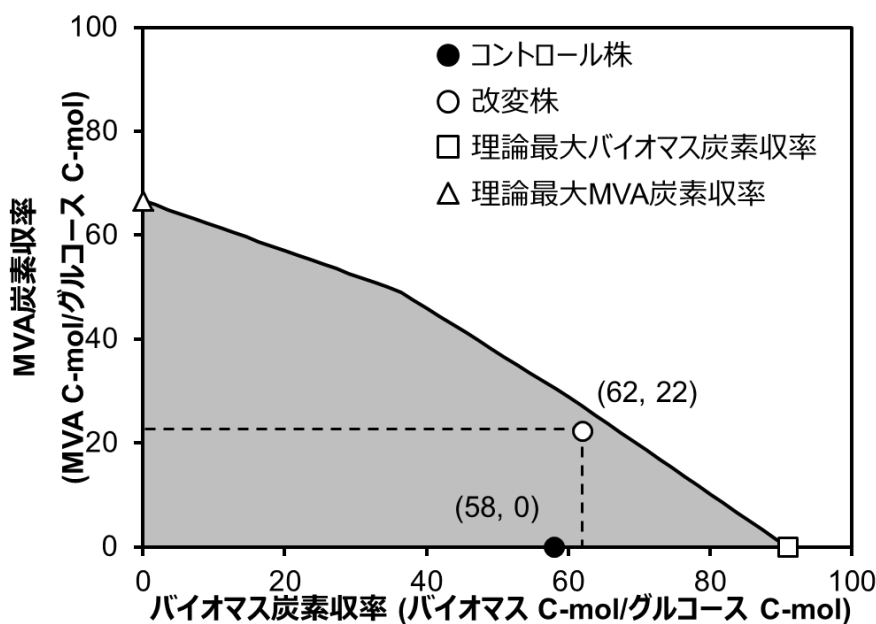


図 2-6 バイオマス炭素収率に対する MVA 炭素収率の取りうる領域

実線で囲まれた灰色領域は大腸菌の取りうる代謝状態を示す。コントロール株および改変株のグルコース比消費速度を基準に増殖速度および MVA 比生産速度の炭素収率を算出し、対応する領域にそれぞれ黒丸(●)および白丸(○)として描画した。白三角(△)および白四角(□)はそれぞれ理論最大 MVA 炭素収率および理論最大バイオマス炭素収率を表す。

白四角(□)は、取り込んだグルコースを全て細胞合成に使った際の収率を示しており、MVA 収率は 0%となった。対照的に、白三角(△)は、取り込んだグルコースを全て MVA 生合成に使った時(細胞合成には使っていない)の収率を示しており、MVA 収率は 67%となった。これは PYR (3 炭素)が AcCoA (2 炭素)に変換される際に失う炭素が反映されている。黒い丸(●)および白い丸(○)は、それぞれコントロール株および改変株の炭素収率を示しており、MVA 炭素収率:バイオマス炭素収率はそれぞれ 22:62 および 0:58 であった。また、両株とも灰色領域内に位置しており、シミュレーション結果の妥当性が見られた。改変株について、MVA 炭素収率は現在のバイオマス炭素収率あたりの最大 MVA 炭素収率とほとんど同等であった。

### 2-3-3 コントロール株および改変株のフラックス分布の比較

コントロール株および改変株のフラックス分布を  $^{13}\text{C}$ -MFA で求めた。両株は $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースを単一炭素源とする合成培地で培養し、タンパク質由来アミノ酸中の  $^{13}\text{C}$  標識割合(本研究では培養開始後 5-6 時間の間での累積値)は GC-MS で測定した。リンゴ酸酵素による補充経路(MAL→PYR)について、至適条件における酵素活性値をフラックスに変換した際の値が非常に小さかったため( $< 0.01 \text{ mmol/gDCW/h}$ )、代謝モデル上から排除した。フラックス分布の推定に用いたアミノ酸フラグメントの情報は先行研究で用いたものを参考にした(表 2-4、Antoniewicz *et al.*, 2007a)。代謝モデルならびに  $^{13}\text{C}$  標識割合の実測値および推定値は付録表 2-2 に示した。代謝モデルの自由度、独立データ数、および  $\chi$  二乗検定の閾値は、それぞれ 20、88、88 であり、両株とも  $\chi$  二乗検定を通過した(コントロール株;42、改変株;20、 $\alpha=0.05$ )。これは、推定したフラックス分布は、統計的に測定した各代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合を説明していることを意味する。

表 2-4 フラックス分布の推定に用いたアミノ酸フラグメント

	Ala	Asp	Glu	Phe	Gly	Ile	Leu	Ser	Thr	Val	Tyr
57	○	○	○	○	○			○	○	○	
85	○	○		○	○	○		○		○	
157		○	○	○		○		○			
302		○		○							○

各反応の最良適合値(代謝フラックスの絶対値;mmol/gDCW/h)は、代謝経路上に図示した(図 2-7、付録表 2-4)。代謝フラックスの最良適合値は、<sup>13</sup>C 標識割合の実験値およびモデルから予想されたシミュレーション値の残差二乗和を最小化することで推定した。例えば、コントロール株において 7.7 mmol/gDCW/h で取り込まれたグルコースは、EMP 経路および PP 経路を使い、それぞれ 5.0 mmol/gDCW/h および 2.7 mmol/gDCW/h で代謝していた。コントロール株のフラックス分布は既報の大腸菌の結果と類似していた(He *et al.*, 2014)。コントロール株および改変株において、EMP 経路、PP 経路、および ED 経路のフラックス値には大きな差が見られなかったものの、AcCoA 以下の代謝経路上において顕著な差が見られた。酢酸生産速度および MVA 生産速度について、コントロール株では 4.4 mmol/gDCW/h(44%)および 0 mmol/gDCW/h(0%)だったのに対し、改変株では 0.4 mmol/gDCW/h(4%)および 1.8 mmol/gDCW/h(52%)であった。また改変株の TCA 回路へのフラックスはコントロール株と比べて小さかった(コントロール株;4.2 mmol/gDCW/h、改変株;2.8 mmol/gDCW/h)。これらのことは、MVA 生合成遺伝子の発現させた改変株では、AcCoA が MVA 生合成経路に再分配されたことを示す。



費の速度バランスを積み上げグラフで図示した(図 2-8)。両株の NADPH 再生/消費の不均衡状態は、NAD(P)<sup>+</sup>酸化還元酵素(トランスヒドロゲナーゼ;  $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$ )によって補填され、細胞内の恒常性が維持されていると考えられる。NADPH 再生/消費速度全体の大きさは、コントロール株に比べて改変株の方が 1.5 倍程度大きかった。すなわち、改変株の NADPH の入替速度はコントロール株よりも大きいと言える。この差は NADPH を消費する MVA 生産と関係しており、改変株では MVA 生産に必要な NADPH をトランスヒドロゲナーゼによって補填していることを意味している。

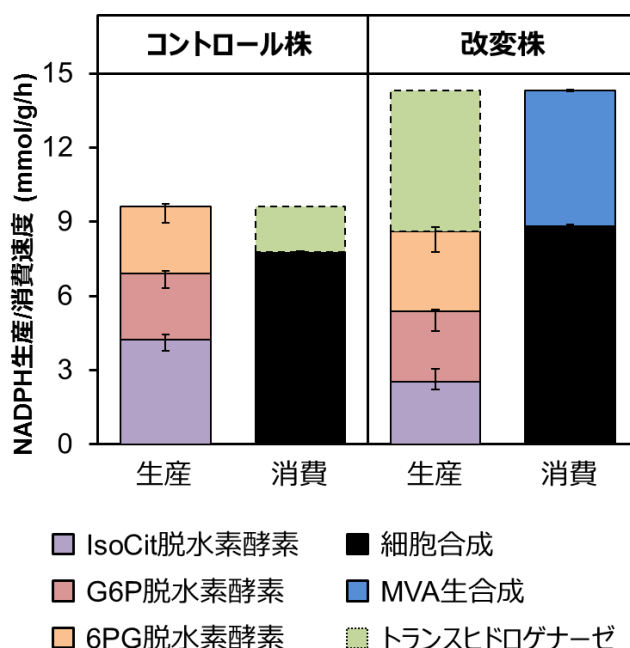


図 2-8 コントロール株および改変株の NADPH の再生/消費バランス

細胞内における NADPH の酸化還元速度はフラックス値から求めた。トランスヒドロゲナーゼは生産および消費のバランスを整えるように機能したと考えられる。エラーバーはフラックスの 95% 信頼区間を示す。

He らは、大腸菌では脂肪酸の生産に応じてフラックスが変化することを報告している(He *et al.*, 2014)。脂肪酸は MVA と同様に、AcCoA および NADPH を用いて生合成される。本研究で確認された酢酸生産速度の低下およびトランスヒドロゲナーゼによる NADPH 再生速度の向上は、先行研究で確認された特徴と一致していた。一方で、増殖速度の低下、PP 経路のフラックスの増加、および補充経路のフラックスの低下は、本研究では確認されなかった。先行研究において、遊離脂肪酸は細胞膜に悪影響を与えることが示されており(Youngquist *et al.*, 2012)、脂肪酸を生産する大腸菌株は生産しない株に比べて細胞維持のためのエネルギー

が余計にかかることが影響していると考えられる。MVA 生産のケースでは、MVA に毒性がないため、増殖速度に対する悪影響は見られなかった。TCA 回路上の補充経路の役割はバイオマス構成要素の前駆体の供給であるため、コントロール株と改変株において差が見られなかった。さらに、脂肪酸(C16:0)の生合成には 8 分子の AcCoA および 14 分子の NADPH を必要とするのに対し、MVA の生合成には 3 分子の AcCoA および 2 分子の NADPH を必要とする。MVA 生合成は、脂肪酸生合成に比べて要求される NADPH の量が少ないため、改変株では MVA 生合成に必要な NADPH の確保をトランスヒドロゲナーゼのみ(PP 経路を必要としない)で補填できたと考えられる。

#### 2-3-4 MVA の高生産を指向した代謝改変箇所の予測

さらなる代謝改変による MVA 生産能力の改善可能性を調査するため、 $^{13}\text{C}$ -MFA を用いて実験的に求めた現在のフラックス分布とシミュレーションで求めた理想的なフラックス分布を比較した。MVA 生産の最大化を目的関数とした FBA を用いて理想的なフラックス分布(MVA の理論最大収率を達成する際のフラックス分布)を算出した(図 2-9)。グルコース取込速度は改変株の実験値(8.2 mmol/gDCW/h)を用いた。代謝状態は白い三角( $\Delta$ )の位置に相当している(図 2-6)。シミュレーションで求めた理想のフラックス分布では、取り込んだグルコースは EMP 経路を用いること、および AcCoA からのフラックスを全て MVA 生合成に用いていた。この際、EMP 経路の競合経路である PP 経路および MVA 生合成経路の競合経路である酢酸生合成経路ならびに TCA 回路は抑制されていた。シミュレーションの結果から、クエン酸合成酵素(AcCoA $\rightarrow$ CIT)およびグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6P $\rightarrow$ 6PG)の抑制が MVA 生産能力の改善に有効である。しかし、クエン酸合成酵素は細胞合成に必要な遺伝子であるため、この遺伝子の完全な欠失は微生物による効率的な物質生産を行う上で好ましくない。この問題に対し、クエン酸合成酵素の発現を切り替えるスイッチ機能は有効である。既に Soma らは大腸菌上で機能するクエン酸合成酵素の発現スイッチを構築しており、細胞増殖期とイソプロパノール生産期を切り替えることで生産性を向上させることに成功している(Soma *et al.*, 2014)。このスイッチ機能を本研究の改変株にも応用することで、理想的な代謝状態に近づけられるかもしれない。また、取り込んだ炭素源をバイオマス合成に消費しにくい流加培養プロセスを採用することで MVA の高収率化を達成することが期待される。

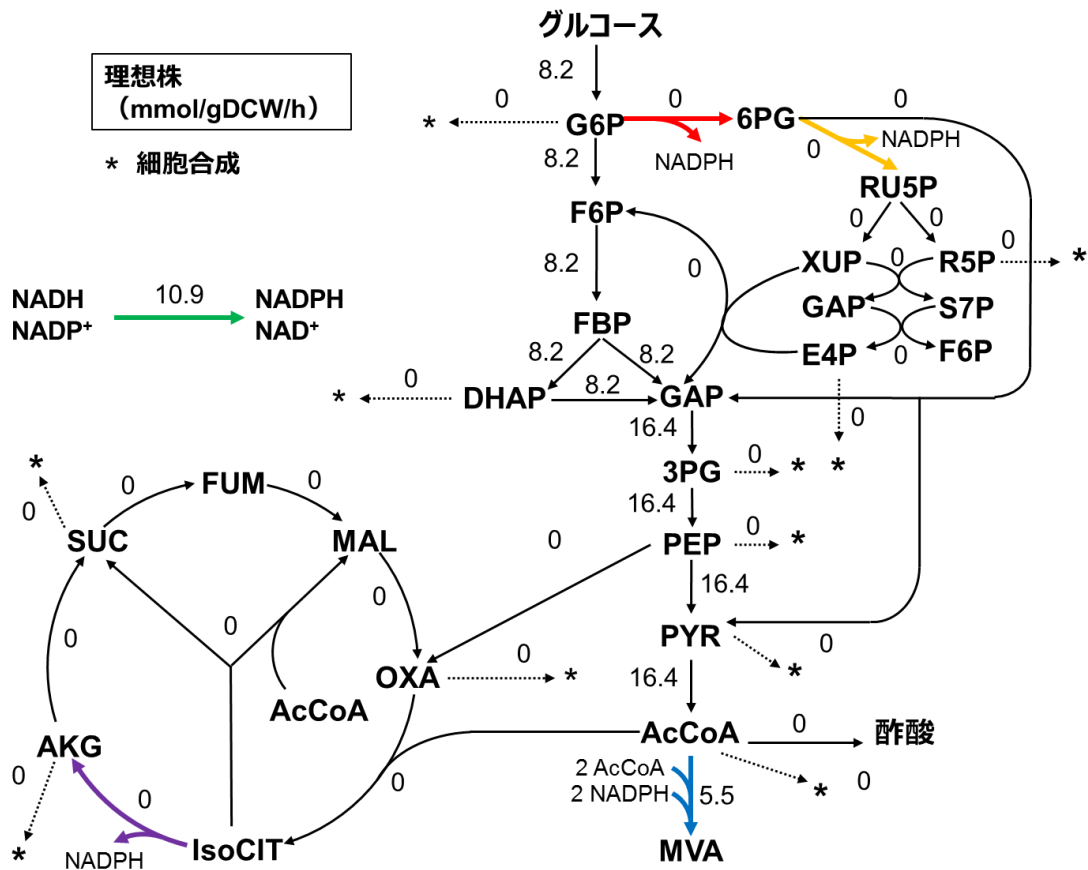


図 2-9 シミュレーションで求めた理論最大 MVA 生産株のフラックス分布

代謝物間の矢印は反応の向き、および矢印に付随する数値は各反応のフラックス値を表す。アスタリスクは増殖速度から割り出した細胞合成に必要な代謝物の生産速度を示す。赤、橙、紫、青、および緑の矢印は NADPH に関わる反応を示す。

## 2-4 結言

本章では、MVA を生産する大腸菌による MVA の生合成に必要な NADPH の再生箇所の特定を目的とし、MVA 生産株および非生産株に対して <sup>13</sup>C-MFA を行い、MVA 生産中の大腸菌の代謝状態を初めて明らかにした(図 2-10、課題1)。両株の中心代謝経路上のフラックス分布を算出したところ、グルコースの取込速度に大きな差はなく、細胞内で NADPH を生産する主な反応である PP 経路のフラックスにも差が見られなかった(図 2-7)。一方、AcCoA から分岐経路へのフラックスの分配は大きく異なっており、MVA 生産菌では酢酸および TCA 回路へのフラックスを MVA 生合成経路に再分配していることが明らかになった(図 2-7)。また、中心代謝経路上のフラックス分布から算出した補酵素の酸化還元速度のバランスは、非生産株では酸化速度よりも還元速度の方が大きかったのに対し、生産株では還元速度よりも酸化速度の方が大きかった(図 2-8)。ただし、細胞内では NADPH の酸化還元速度は定常状態に保た

れることから、酸化および還元速度の差はトランスヒドロゲナーゼによって補填されたことを明らかにした(図 2-8)。

さらに、*in silico* 代謝シミュレーション技術(FBA)を用いて、取り込んだグルコースを最大効率でMVAを生産した場合の理想的な代謝状態を算出し、<sup>13</sup>C-MFAで求めた現在のMVA生産株の代謝状態と比較することで、MVAの効率的な生産に有効な代謝改変箇所を特定した(図 2-10、課題2)。シミュレーションで求めたフラックス分布について、取り込んだグルコースは全てEMP経路で代謝し、AcCoAからの分岐経路ではMVAの生合成経路のみに分配し、MVA生合成に必要な全てのNADPHをトランスヒドロゲナーゼで生産することが明らかになった(図 2-9)。現在の株では、PP経路、酢酸生合成経路、およびTCA回路へのフラックスがあるため、これらの経路へのフラックスの遮断およびトランスヒドロゲナーゼの発現を強化することで理想のフラックス分布に近づけられる。ただし、TCA回路の恒常的な遮断ことは細胞合成能力の不活化につながるため、物質生産に必ずしも有利ではない。この問題について、先行研究において構築されたTCA回路へのフラックス分配の切り替えスイッチ機能を応用することで、より実用的な物質生産株を創出できると考えられる。

### 課題 1

MVA生産株の代謝状態を明らかにする  
(<sup>13</sup>C-MFA)

- PP経路のフラックスは非生産株と同程度であった
- 酢酸経路、TCA回路のフラックスをMVA経路に再分配していた
- トランスヒドロゲナーゼがNADPHを生産している

### 課題 2

MVAの高生産化に向けた代謝改変戦略を立案する  
(FBA)

- PP経路、酢酸経路、TCA回路を遮断する
- TCA回路のフラックスを制御できるシステムを採用する
- NADPHはトランスヒドロゲナーゼのみで生産する

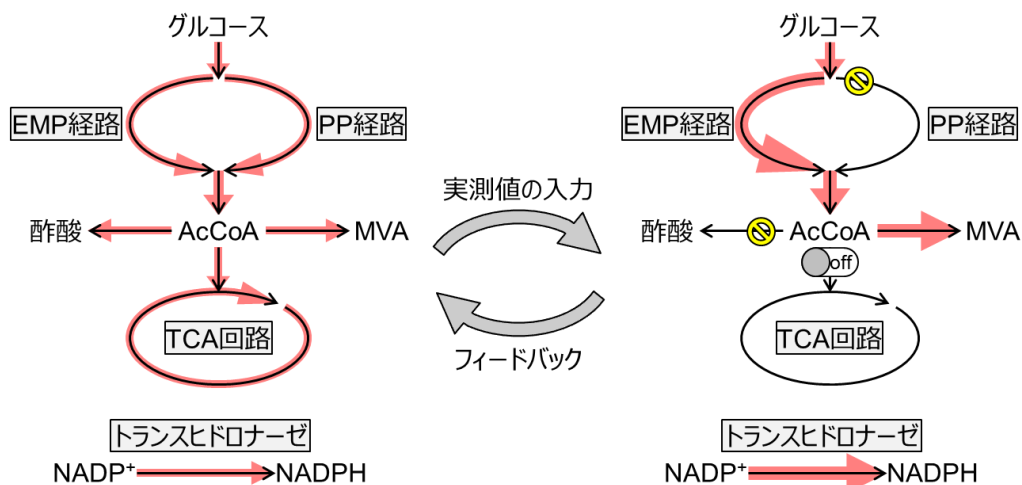


図 2-10 本章の概要

本研究では、 $^{13}\text{C}$ -MFA に加え、代謝状態を推定する手法である FBA を採用し、MVA の高生産化に向けた代謝改変箇所を特定した。本研究で扱った MVA 生産株は、現在の増殖速度およびグルコース取込速度あたり、ほとんど最大の MVA 生産速度を達成していたため(図 2-6)、増殖速度およびグルコース取込速度の制約下において高生産化が見込めないことが明らかになった。そこで、高生産化の目標値を設定するため、*in silico* 代謝シミュレーション法の一つである FBA を採用し、現在のグルコース取込速度を入力値として最大 MVA 生産速度およびフラックス分布を算出した。 $^{13}\text{C}$ -MFA および FBA の結果を組み合わせる試みは大腸菌および *Geobacillus* 属による有用物質生産に関する先行研究において採用されていることから(Tang *et al.*, 2009、Chen *et al.*, 2011)、両手法を組み合わせる代謝状態を議論することは妥当であると考えられる。本研究の特徴は、FBA で求めたフラックス分布と  $^{13}\text{C}$ -MFA で求めたフラックス分布を比較し、高生産化に向けた代謝改変箇所の示唆を得た点にある。得られた示唆に基づいて解析対象株を改変し、再度  $^{13}\text{C}$ -MFA および FBA を行うことで、優れた細胞工場の創出への貢献が期待できる。

本研究において、MVA 生産株ではトランスヒドロゲナーゼによる MVA の生合成に必要な NADPH の確保、非生産株では細胞内の過剰な NADPH の消費に寄与していたことを明らかにした。大腸菌のゲノム DNA 上には、トランスヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が2種類存在する(NADPH 再生型;*pntAB*、NADPH 消費型;*udhA*)。トランスヒドロゲナーゼは炭素源、あるいは還元力などの細胞原料を消費せずに NADPH の再生および消費を行えるため、物質生産系にトランスヒドロゲナーゼを利用することは有効であると言える。例えば、*pntAB* は PP 経路と並んで、細胞内における主要な NADPH 再生として利用されており、NADPH を還元力とした脂肪酸生産の先行研究において、細胞の NADPH 要求に応じて NADPH 再生速度が 1.7 倍程度まで向上した例がある(He *et al.*, 2013)。また、元来トランスヒドロゲナーゼをもたない *Bacillus subtilis* および *C. glutamicum* に対して大腸菌由来の *pntAB* 遺伝子を導入した先行研究では、イノシトールならびに酢酸、コハク酸および L-リジンの生産速度の向上に寄与したことが報告されている(Tanaka *et al.*, 2017、Yamauchi *et al.*, 2014、Kabus *et al.*, 2007)。一方、*udhA* 遺伝子を過剰発現させることあるいは異種遺伝子を発現させることでポリヒドロキシ酪酸あるいはエタノールの生産にも成功している(anchez *et al.*, 2006、Romero *et al.*, 2007)。しかし、中心代謝経路とトランスヒドロゲナーゼによる NADPH の再生/消費バランスに関する知見は乏しく、細かなチューニングを要することが予想される(Sauer *et al.*, 2004)。本章で提案された代謝改変戦略も含め、トランスヒドロゲナーゼを用いた物質生産系を構築および改変するためには、トランスヒドロゲナーゼが解消できる、細胞内の NADPH の再生/消費バランスの範囲に関する知見をさらに深める必要があるだろう。

## 第3章 *n*-ブタノールを生産する *Synechococcus elongatus* PCC

### 7942 の代謝解析

#### 3-1 緒言

第1章において、本論文の解析対象とする有用物質生産宿主および目的化合物を定義した。第3章では、独立栄養生物、かつ目的化合物の生合成に NADPH を要する、シアノバクテリアによる *n*-ブタノール生産の例を挙げ、物質生産中のシアノバクテリアの代謝状態の解析を通して、物質生産の効率化に向けて有効な代謝改変箇所の特定を目指した。

シアノバクテリアは酸素発生型の光合成を行う微生物を指し、大気中の二酸化炭素を炭素源とするため、シアノバクテリアを用いた物質生産は、石油産業による物質生産に比べて二酸化炭素の排出が少ないこと、およびヒトの食糧需要と競合しないことなどの理由から、環境負荷の少ない優れた宿主として注目されている。また、全ゲノム配列が公開されていること、遺伝子操作方法が確立されていること、およびシアノバクテリアの光合成効率は陸上植物と比べて高いことなどから、現在までにアルコール類、炭水化物、カルボン酸、およびテルペノイドなど、様々な有用物質生産系が構築されている (Kusakabe *et al.*, 2013, Lan *et al.*, 2013, Atsumi *et al.*, 2009, Lindberg *et al.*, 2010, Ducat *et al.*, 2012)。しかし、既に実用化されている有用物質生産系をもつ大腸菌などの微生物に比べると、増殖速度および物質生産速度が低く、代謝の理解および改善が望まれている。シアノバクテリアの光合成には光化学系と称されるタンパク質群が用いられる。光化学系では補酵素を生産するため、シアノバクテリアの中心代謝経路と光化学系は密接に関係している。そのため、シアノバクテリアによる物質生産性の向上に向けた代謝の改変には双方の理解が不可欠である。

*n*-ブタノール (BuOH) は 4 炭素の飽和脂肪族に属するアルコールであり、吸湿性および揮発性の低さ、ならびに高いエネルギー密度などの特徴を有することから、ガソリンの代替燃料として有用性が認められている。BuOH は繊維、ラッカー、プラスチック、および香料などの化学原料として使用される。微生物による BuOH 生産の歴史は古く、*Clostridium* 属細菌によるアセトン-ブタノール-エタノール発酵に端を発する (Wilkins and Atiye, 2012)。*Clostridium* 属細菌は補酵素を還元力とし、AcCoA から 6 反応を介して BuOH を生合成する。この生合成経路を CoA 依存的経路と称し、関連遺伝子群を導入することで異種微生物による BuOH 生産を可能にした (Shen *et al.*, 2011, Schadeweg and Boles, 2016, Brezina *et al.*, 2010)。先行研究において、導入する生合成経路上の酵素遺伝子を工夫し、好気条件で BuOH を生産する *Synechococcus elongatus* 株が構築された (Lan *et al.*, 2013)。この株はシアノバクテリアの中で

BuOH 生産量が最も多いため(404 mg/L/12-day)、BuOH 生産による補酵素および炭素消費が激しく、代謝システムに影響を与えていると考えられる。

$^{13}\text{C}$ -MFA は物質収支制約および安定同位体標識実験に基づいて中心代謝経路上の代謝フラックスを推定する手法であり(Wiechert, 2001、Wittmann, 2007)、本研究では二酸化炭素を単一炭素源としたシアノバクテリアの先行研究例のある、安定同位体非定常解析を採用した(図3-1)。シアノバクテリアの場合、炭素原子を1つしかもたない二酸化炭素を炭素源とするため、 $^{13}\text{C}$  標識した二酸化炭素を用いて培養した場合、最終的に全ての代謝物の標識割合は与えた二酸化炭素の  $^{13}\text{C}$  標識割合に収束する。すなわち、安定同位体定に達した代謝物からは経路特有の標識が得られず、大腸菌の解析で用いた方法ではフラックスが推定できないことを意味する。一方、安定同位体非定常解析では、数分以内に収束する  $^{13}\text{C}$  標識率の推移過程を解析対象としているため、各代謝物に含まれる  $^{13}\text{C}$  標識割合はフラックスおよび代謝物量に依存してそれぞれ独特な様態を呈す。この際、最も早く  $^{13}\text{C}$  標識が推移するのは、 $^{13}\text{C}$  標識された炭素源が直接変換される中心代謝経路上の代謝物であり、既にシアノバクテリアにおける解析の例が報告されている(Young *et al.*, 2011、Nakajima *et al.*, 2017)。そこで本研究では、フラックス分布および NADPH の酸化還元バランスの情報から BuOH を生産するシアノバクテリアの代謝状態の解明を目指した。また、 $^{13}\text{C}$ -MFA、プロテオーム解析、および酸素発生速度の測定結果を統合し、BuOH の効率的な生産に有効な代謝改変箇所の特定を目指した。

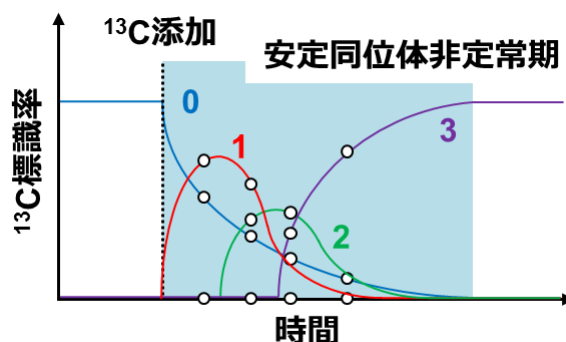


図 3-1 本章で扱う  $^{13}\text{C}$ -MFA の種類

炭素数3の代謝物に  $^{13}\text{C}$  標識した炭素が取り込まれる過程。 $^{13}\text{C}$  を添加した直後から代謝物に  $^{13}\text{C}$  が取り込まれはじめ、一定時間経過後には安定同位体の存在比が定常に達する。安定同位体非定常解析では  $^{13}\text{C}$  標識率が遷移する様態(水色領域)からフラックス分布を推定するため、この期間に複数回のサンプリングを行い、代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合のデータを得る(○)。色つきの数字は代謝物中の  $^{13}\text{C}$  の数を示す。

## 3-2 実験材料および実験方法

### 3-2-1 培地組成および使用菌株

培養には改変 BG-11 培地(合成培地;1.5 g/L 硝酸ナトリウム、27 mg/L 塩化カルシウム・2 水和物、4.5 mg/L 塩化鉄(II)・4 水和物、1.2 mg/L 塩化アンモニウム、1 mg/L 二ナトリウム塩・2 水和物、31 mg/L リン酸水素二カリウム、75 mg/L 硫酸マグネシウム・7 水和物、2.9 mg/L ホウ酸、1.8 mg/L 塩化マンガン(II)・4 水和物、0.22 mg/L 硫酸亜鉛・7 水和物、0.39 mg/L モリブデン酸ナトリウム・2 水和物、79 µg/L 硫酸銅・5 水和物、49 µg/L 塩化コバルト(II)・6 水和物、4.2 g/L 炭酸水素ナトリウム、および 20 mM ヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホン酸-水酸化カリウム緩衝液;pH 7.5)。固体培地は 15 g/L 寒天を含む。必要に応じて、カナマイシン、スペクチノマイシン、および IPTG をそれぞれ、10 mg/L、20 mg/L、および 24 mg/L になるように添加した。

本研究では、*S. elongatus* PCC 7942(コントロール)株および先行研究において構築された派生の株(BuOH 生合成遺伝子を導入した株;改変株)を用いた(Lan *et al.*, 2013)。改変株のニュートラルサイト 1 および 2 にはそれぞれ *trc* プロモーター配下に *ter*(Q73Q47)ならびに *LlacO1* プロモーター配下に *nphT7*(BAJ10048)、*pduP*(AAD39015)、*yqhD*(AAC76047)、*phaJ*(O32472)、および *phaB*(AEI76813)が導入されているため、IPTG を添加することでこれらの遺伝子の発現が誘導され、BuOH を生産するようになる。

### 3-2-2 細胞濁度および乾燥菌体重量測定

経時的に培養液を回収し、分光光度計(UVmini-1240;Shimadzu)を用いて、培養液の 730 nm における濁度(OD<sub>730</sub>)を測定した。乾燥菌体重量を測定するため、OD<sub>730</sub> ≈ 1 の培養液 25 mL をろ過し、0.9% 食塩水を用いて洗浄した後、フィルターごと 70°C で十分乾燥させた。乾燥したフィルターの重量を測定し、乾燥菌体重量(gDCW/L/OD<sub>730</sub>)を算出した。

### 3-2-3 培養条件

冷凍保存菌体を改変 BG-11 固体培地に塗布後 30°C、100 µE/m<sup>2</sup>/s で培養し、コロニーを単離した。前培養として、改変 BG-11 液体培地 20 mL を入れた 100 mL エルレンマイヤーフラスコにコロニーを植菌し、OD<sub>730</sub> ≈ 1 になるまで 30°C、100 µE/m<sup>2</sup>/s で振とう培養した。本培養において、2 日おきに培養液の 10%を廃棄し、新たに廃棄量と等量の 42 g/L 炭酸水素ナトリウムを含む改変 BG-11 液体培地を添加した。<sup>13</sup>C-MFA の本培養について、改変 BG-11 液体培地 500 mL を入れた 1 L 蛍光灯付ジャーファーメンターに初期 OD<sub>730</sub> = 0.05 になるように植菌し、30°C、150 µE/m<sup>2</sup>/s で培養した。プロテオーム解析用の前培養について、改変 BG-11 液体培

地および  $^{15}\text{N}$ -硝酸ナトリウムに置換した改変 BG-11 液体培地 100 mL を入れた 500 mL エrlenmeyer フラスコに初期  $\text{OD}_{730} = 0.05$  になるように植菌し、 $30^\circ\text{C}$ 、 $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  で培養した。光量子束密度は光量子計 (LI-250A、LI-190SA; メイワフォーシス) を用いて測定した。

### 3-2-4 培地成分の測定

経時的に培養液を回収し、 $18,000 \times g$ 、5 分間、 $4^\circ\text{C}$  で遠心分離した。上清は  $0.45 \mu\text{m}$  のフィルター (Millex HV; Merck KGaA) でろ過し、使用するまで  $-30^\circ\text{C}$  で保存した。水素炎イオン化検出器を搭載したガスクロマトグラフィー (GC; Agilent 7890A GC system; Agilent Technology) を用いて、培養液中の BuOH 濃度を測定した。等量の培養液上清および内部標準液 (0.1% 3-メチル-1-ブタノール) を混合し、GC 分析に供した (表 3-1)。

表 3-1 GC の分析条件

装置	Agilent 7890A GC (Agilent Technologies)
カラム	DB-WAX 123-7062 ( $60 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm} \times 1 \mu\text{m}$ ; Agilent Technologies)
昇温条件	$50^\circ\text{C}$ (2 分) $\sim +10^\circ\text{C}/\text{分}$ (5 分) $\sim +30^\circ\text{C}/\text{分}$ (5 分) $\sim 250^\circ\text{C}$ (4 分)
キャリアガス	ヘリウム
注入量	$1 \mu\text{L}$
注入法	スプリットモード (10:1)
検出器	水素炎イオン化検出器 ( $250^\circ\text{C}$ )

### 3-2-5 細胞内グリコーゲンの測定

対数増殖期中に回収した乾燥菌体重量 1 mg に相当する菌体を 30% 水酸化カリウムで再懸濁し、 $95^\circ\text{C}$  で 90 分間処理した。その後、冷えたエタノールを添加して 60 分間氷上で冷却し、 $18,000 \times g$ 、5 分間、 $4^\circ\text{C}$  で遠心分離した。上清を捨て、沈殿物をよく乾燥させた後、Milli-Q で再懸濁し、グリコーゲンサンプルとした。グリコーゲン濃度は EnzyChrom Glycogen Assay Kit (E2GN-100; BioAssay Systems) の手順に従って測定した。

### 3-2-6 酸素発生速度の測定

クロロフィル含有量の測定は先行研究の方法に従った (Grimme and Broadman, 1972)。 $\text{OD}_{730} \approx 2$  の培養液を回収し、クラーク型の酸素電極 (Oxytherm system; Hansatech Instruments) に供した。以降の操作は常に  $30^\circ\text{C}$  を維持した。まず暗闇時の酸素消費速度 (呼

吸活性)を3分間測定し、1,000  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  の光照射時の酸素発生速度(光合成活性-呼吸活性)を3分間測定した。

### 3-2-6 LC-MS/MS による $^{13}\text{C}$ 標識割合の測定

蛍光灯付ジャーファーメンターで培養した  $\text{OD}_{730} \approx 2$  の培養液の 10% を廃棄し、新たに廃棄量と等量の 42 g/L [ $^{13}\text{C}$ ]炭酸水素ナトリウムを添加し、経時的に 10 mL の培養液を回収した(0、1、2、3、4、5、10、30、および 60 分)。回収した培養液をフィルターろ過し、フィルターごと 5  $\mu\text{M}$  (+)-10-カンファースルホン酸を含む冷メタノール溶液に漬け込んだ。菌体回収からメタノール浸漬までの操作は 15 秒以内に行った。細胞内代謝物はメタノール-クロロホルム-水法を用いて抽出した(Nishino *et al.*, 2015)。抽出液を 1.5 mL チューブに移し、SpeedVac SPD1010 (Thermo Fischer Scientific)を用いて 60°C で減圧乾固し、使用するまで -80°C で保存した。乾燥サンプルは Milli-Q で再懸濁し、タンデム四重極型液体クロマトグラフ-質量分析計(Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, LC-MS/MS)に供した(表 3-2)。

表 3-2 LC-MS/MS の分析条件

装置	Nexera UPLC、LCMS 8030 (Shimadzu)	
カラム	ProteCol-P C18 HQ103 (150 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 3 $\mu\text{m}$ ; SGE analytical Science)	
カラム温度	35°C	
注入量	3 $\mu\text{L}$	
流速	0.2 mL/分	
イオン化	エレクトロスプレーイオン化法	
溶離液 A	15 mM トリブチルアミン、10 mM 酢酸を LC-MS グレードの超純水に溶かして調製	
溶離液 B	メタノール(LC-MS グレード)	

時間 (分)	溶離液 A (%)	溶離液 B (%)
0	100	0
8	100	0
24	10	90
24.1	100	0
30	100	0

### 3-2-7 nano LC-MS/MS によるタンパク質量の測定

フラスコで培養した  $OD_{730} \approx 2$  の培養液を、 $18,000 \times g$ 、5 分間、 $4^{\circ}\text{C}$  で遠心分離した。菌体ペレットは 5% グリセロール、15 mM ジチオスレイトール、100 mM 塩化カリウム、5 mM エチレンジアミン四酢酸、cComplete protease inhibitors cocktail tablets (Roche Life Science)、および 50 mM ヒドロキシエチルピペラジニエタンスルホン酸-水酸化カリウム緩衝液で再懸濁し、ジルコニアビーズおよびビーズ破砕器 ( $\mu\text{T-12}$ ; Taitec) を用いて細胞を破砕した。抽出液は  $18,000 \times g$ 、5 分間、 $4^{\circ}\text{C}$  で遠心して上清を得た。

タンパク質濃度はブラッドフォード法で定量した。抽出液は 500 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸、10 mM エチレンジアミン四酢酸、および 7 M グアニジン-塩酸を含む緩衝液で変性させ、50 g/L ジチオスレイトールおよび 50 g/L ヨードアセトアミドを用いてタンパク質を化学的に修飾した。プロテアーゼ処理前にメタノール-クロロホルム沈殿を行った。上清を完全に除去し、500 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸および 6 M 尿素を含む緩衝液に再懸濁した。サンプルはエンドプロテアーゼ Lys C (Wako)、Protease Max (Promega)、およびトリプシン (Promega) で処理した。50% ギ酸を混合し、改変 BG-11 液体培地および  $^{15}\text{N}$ -硝酸ナトリウムに置換した改変 BG-11 液体培地由来のサンプルを等量ずつ混合し、GL-Tip<sup>TM</sup> GC (GL sciences) を用いて脱塩した。脱塩したサンプルは SpeedVac SPD1010 (Thermo Fischer Scientific) を用いて減圧乾固し、0.1% ギ酸で再懸濁したサンプルを nano LC-MS/MS に供した(表 3-3)。

表 3-3 nano LC-MS/MS の分析条件

装置	Nexera UPLC、LCMS 8040 (Shimadzu)
カラム	L-column Micro (150 mm $\times$ 0.1 mm $\times$ 3 $\mu\text{m}$ ; CERI)
カラム温度	$25^{\circ}\text{C}$
注入量	1 $\mu\text{L}$
流速	0.4 $\mu\text{L}/\text{分}$
イオン化	エレクトロスプレーイオン化法
溶離液 A	5% アセトニトリル、0.1% ギ酸を LC-MS グレードの超純水に溶かして調製
溶離液 B	95% アセトニトリル、0.1% ギ酸を LC-MS グレードの超純水に溶かして調製

時間 (分)	溶離液 A (%)	溶離液 B (%)
0	100	0
7	100	0
45	35	65
50	0	100

### 3-2-8 安定同位体非定常状態における $^{13}\text{C}$ -MFA

$^{13}\text{C}$ -MFA に利用する質量分析データのハンドリング、代謝モデルの構築、実験で得られた各代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合を説明するフラックス分布の推定、および各フラックスの 95% 信頼区間の算出には OpenMebius (Kajihata *et al.*, 2014) を用いた。代謝物質中に天然の割合で存在する炭素、水素、酸素、窒素、およびケイ素の同位体の影響は先行研究の方法に従って除去した (van Winden *et al.*, 2002)。シアノバクテリアの中心代謝経路モデルには、CBB 回路、EMP 経路、PP 経路、グリコーゲン生合成/分解経路、補充経路、 $\alpha$  ケトグルタル酸脱水素酵素による反応が欠けた TCA 回路、および BuOH 生合成経路が含まれる (付録表 3-1)。増殖のために必要な細胞構成成分の前駆体の要求フラックスは乾燥菌体量当たりの前駆体量の文献値に比増殖速度の実験値を乗じて算出した (Young *et al.*, 2011)。コントロール株および改変株の MIV の標準偏差はそれぞれ 0.05 とした。フラックス値および代謝物濃度は、測定した経時的な MID の推移データを参照にして、推定した経時的な MID データを非線形最適化することで決定した。この際、各代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合は EMU を用いて計算した (Antoniewicz *et al.*, 2007b)。MATLAB が提供する非線形最適化ソルバー *fmincon* を利用し、式 3-1 の目的関数が最小となるフラックス分布を探索した。

$$\text{RSS} = \sum_i \sum_t \left( \frac{M_{i,t,\text{exp}} - M_{i,t,\text{sim}}}{\sigma_{i,t}} \right)^2 \quad (\text{式 3-1})$$

この際、 $M_{i,t,\text{exp}}$  および  $M_{i,t,\text{sim}}$  は、それぞれ時間  $t$  における代謝物  $i$  の  $^{13}\text{C}$  標識割合の測定値および推定値を示す。 $\sigma$  は MID の標準偏差を示す。

## 3-3 結果および考察

### 3-3-1 生育特性の評価

BuOH 非生産 (コントロール; 野生型) 株および BuOH 生産 (改変; 染色体 DNA 上に 6 種類の BuOH 生合成用異種遺伝子をもつ) 株を用い、両株の代謝の違いを明らかにした。BuOH

生合成遺伝子群の発現は IPTG の添加によって誘導できる (Lan *et al.*, 2013)。両株は、二酸化炭素を単一炭素源とした大規模培地 (500 mL 光バイオリアクター、150  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ )、好気的に回分培養し、 $\text{OD}_{730} \approx 0.5$  の際に IPTG を添加した。両株の細胞増殖および代謝物濃度を図 3-2 に、生育特性 (比増殖速度、比グリコーゲン蓄積速度、および比 BuOH 生産速度) 値を表 3-4 に示した。

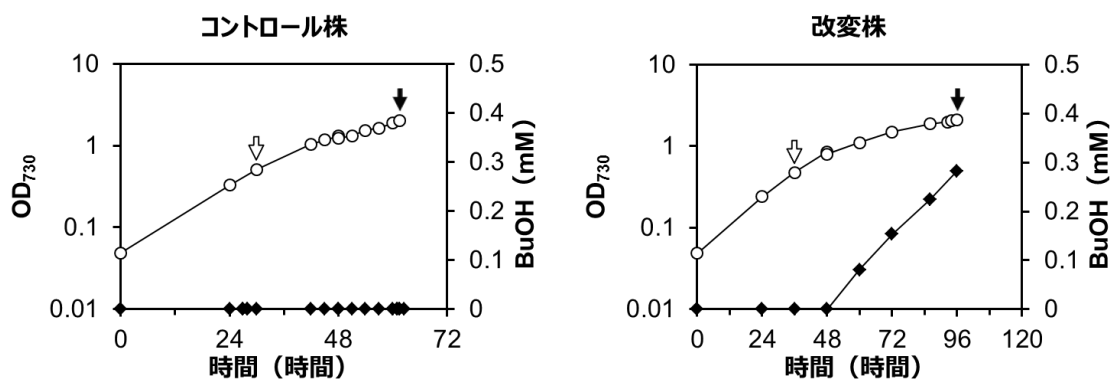


図 3-2 コントロール株および改変株の生育特性

二酸化炭素を単一炭素源とする培地において好気条件で回分培養した。光培養リアクターおよび解析の都合上、 $N = 1$  のデータを示す。○は細胞濁度、◆は BuOH 濃度、白矢印は IPTG 添加点、黒矢印は細胞回収点を示す。

表 3-4 コントロール株および改変株の各種比速度

株名	比増殖速度 (1/h)	BuOH 比生産速度 (mmol/gDCW/h)	グリコーゲン比生産速度 (mmol/gDCW/h)
コントロール株	0.04	N.D.	0.02
改変株	0.03	0.01	0.06

対数増殖期中 ( $\text{OD}_{730} \approx 1.5 \sim 2$ ) の比速度を算出した。光培養リアクターおよび解析の都合上、 $N=1$  のデータを示す。N.D.は検出不能を示す。

BuOH 生産速度について、コントロール株は全く生産しなかったが、改変株では 0.01 mmol/gDCW/h の生産が見られた。また HPLC による培地上清の分析では、両株とも有機酸は検出されなかった。一方、 $\text{OD}_{730} \approx 2$  付近の対数増殖期における比増殖速度について、改変株はコントロール株よりも若干小さかったのに対し (コントロール株; 0.04 1/h、改変株; 0.03 1/h)、グリコーゲン蓄積速度は改変株の方がコントロール株よりも大きかった (コントロール株; 0.02

mmol/gDCW/h、改変株;0.06 mmol/gDCW/h)。比増殖速度の低下は微々たるものであるが、それぞれの倍加時間に換算すると6時間の差が生じていることになる(コントロール株;17時間、改変株;23時間)。対数増殖期中の増殖速度が低下することは、細胞自体の活性度が低下するため効率的な BuOH 生産に向けて不利になる。増殖速度が低下した理由について、生産した BuOH が、細胞合成に必要なエネルギーおよび炭素を確保する中枢代謝に悪影響を与えた可能性が考えられる。この仮説を検証するため、<sup>13</sup>C-MFA を行い、細胞内の炭素の流れを明らかにした。

### 3-3-2 各中間代謝物の <sup>13</sup>C 標識割合の測定

蛍光灯付ジャーファーメンターで培養した OD<sub>730</sub> ≈ 2 の対数増殖期における細胞に対して [1-<sup>13</sup>C]炭酸水素ナトリウムを添加し、代謝物に取り込まれた <sup>13</sup>C 濃縮度の経時的な変化を測定した。細胞は添加直後(0秒後)から300秒後まで60秒ごと、また10、15、30、および60分後に回収した。各代謝物の MID の経時データは LC-MS/MS で分析した。本研究では11種類の代謝物について11種類のイオン化断片が検出された。

各代謝物の <sup>13</sup>C 濃縮度は MID のデータから算出した(図3-3)。全ての代謝物について、<sup>13</sup>C 添加直後の代謝物の <sup>13</sup>C 濃縮度は0に近かった。PEP の <sup>13</sup>C 濃縮度の上昇が最も早く、両株とも5分間で安定同位体定常状態に到達した(コントロール株;68%、改変株;39%)。60分後の <sup>13</sup>C 濃縮度は代謝物ごとに異なるものの、SUC および MAL 以外の全ての代謝物の <sup>13</sup>C 標識速度はほとんど同等であり、SUC および MAL の <sup>13</sup>C 濃縮度は60分後も上昇傾向が見られた。このことは、TCA 回路に比べて CBB 回路の代謝速度が速いことを意味する。同様の傾向は他属のシアノバクテリアにおいても確認されている(Young *et al.*, 2011、Nakajima *et al.*, 2017)。

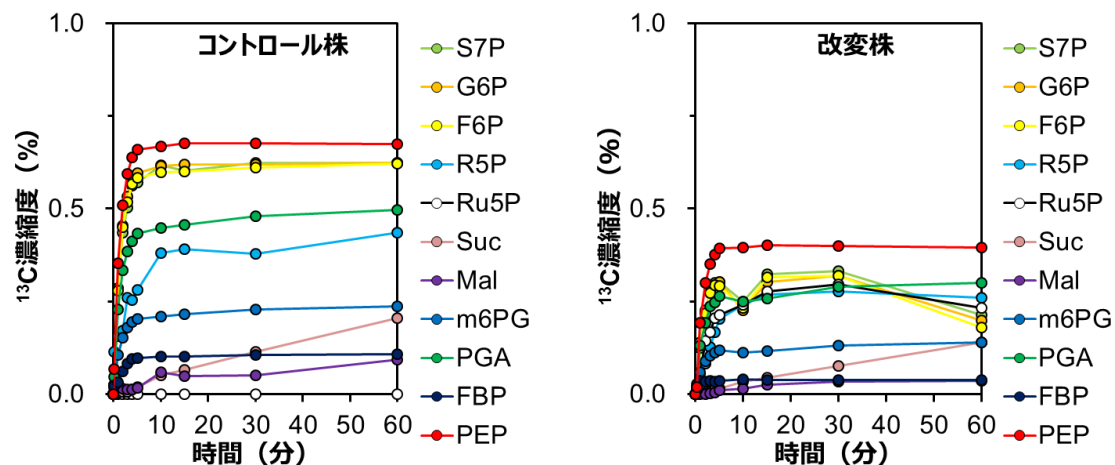


図 3-3 コントロール株および改変株に含まれる各代謝物の  $^{13}\text{C}$  濃縮度の経時的な推移  
 対数増殖期中に  $[1-^{13}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウム添加後を添加し、各代謝物に含まれる  $^{13}\text{C}$  濃縮度の遷移を描画した。光培養リアクターおよび解析の都合上、 $N = 1$  のデータを示す。各代謝物の区別は図内に示した。

### 3-3-3 コントロール株および改変株の代謝フラックス分布の比較

コントロール株および改変株のフラックス分布を安定同位体非定常の  $^{13}\text{C}$ -MFA で求めた。代謝モデルには、CBB 回路、EMP 経路、PP 経路、グリコーゲン生合成/分解経路、補充経路、 $\alpha$ ケトグルタル酸脱水素酵素による反応が欠けた TCA 回路、および BuOH 生合成経路が含まれている。このモデル上の代謝フラックス分布および代謝物濃度は、 $^{13}\text{C}$  添加直後から 5 分後までの MID の経時データ (0、1、2、3、4、および 5 分後) とシミュレーション値の残差二乗和を最小化することで決定した (Jazmin and Young, 2013, Nakajima *et al.*, 2017) (付録表 3-2)。代謝モデルの自由度、独立データ数、および  $\chi$  二乗検定の閾値は、それぞれ 19、197、210 であり、両株とも  $\chi$  二乗検定を通過した (コントロール株; 90、改変株; 124、 $\alpha = 0.05$ )。これは、推定したフラックス分布は、統計的に測定した各代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合を説明していることを意味する。代謝フラックスおよび代謝物濃度の 95% 信頼区間はモンテカルロ法を用いて算出した。

各反応のフラックスの最良適合値 (mmol/gDCW/h) を代謝経路上に図示した (図 3-4、付録表 3-3)。二酸化炭素を固定するため、EMP 経路上流および CBB 回路のフラックスが大きく、代謝経路の分岐点におけるフラックスの分岐比は両株において顕著な差は見られなかった。二酸化炭素固定速度について、改変株はコントロール株に比べて減少していた (コントロール株; 4.58 mmol/gDCW/h、改変株; 3.07 mmol/gDCW/h)。コントロール株の二酸化炭素固定速度は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の先行研究の値とほとんど同等であった (4.63 mmol/gDCW/h, Nakajima *et al.*, 2017)。また、両株とも二酸化炭素固定速度の 90% 以上を

EMP 経路上流である 3PG→GAP に代謝しており(コントロール株;8.96/(4.58×2)、改変株;5.92/(3.07×2))、EMP 経路下流方向である TCA 回路(コントロール株;0.03 mmol/gDCW/h、改変株;0.02 mmol/gDCW/h)および BuOH 生合成(コントロール株;0 mmol/gDCW/h、改変株;0.01 mmol/gDCW/h)へのフラックスは、二酸化炭素固定反応のフラックスに比べて微弱であった。特徴的な代謝状態として、両株とも取り込んだ炭素の 60%以上を PP 経路に流して RUBP を再生していたことが挙げられる(コントロール株;=3.17/4.58、改変株;=1.86/3.07)。EMP 経路上流のフラックスに比べて EMP 経路下流のフラックスが小さいことは他の先行研究と一致していたが(Young *et al.*, 2011、Nakajima *et al.*, 2017)、本研究では PP 経路の利用度が高いことを明らかにした。このことは、*S. elongatus* PCC 7942 の増殖速度が *Synechocystis* sp. PCC 6803 に比べて遅いことと関係しているかもしれない。

シアノバクテリアの場合、リブローズ 1,5-ビスリン酸脱炭酸酵素/酸素付加酵素が固定した二酸化炭素を炭素源として細胞合成に利用する。一方、PP 経路は細胞合成に必要な NADPH を生産する反面、二酸化炭素を排出する。すなわち、RUBP の再生のために PP 経路を利用することは炭素を損失することを意味する。フラックス分布によると、両株における正味の二酸化炭素固定速度は、それぞれ 1.41 mmol/gDCW/h および 1.21 mmol/gDCW/h であり(コントロール株;=4.58-3.17、改変株;=3.07-1.86)、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の先行研究の 3.49 mmol/gDCW/h(=4.63-1.14)の約 40%程度であった。すなわち、*S. elongatus* は細胞合成のための炭素の回収効率が低く、細胞増殖に多くの時間を要すると考えられる。実際に、両株の生育速度は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の先行研究の値(0.089 1/h)の約 40%程度であり(コントロール株;=0.04/0.089、改変株;=0.03/0.089)、二酸化炭素固定速度との間に関連性が見られた(Nakajima *et al.*, 2017)。一般に微生物を用いた物質生産過程において、増殖速度の大きさは、物質生産反応の触媒である菌体の迅速な確保につながるため、培養系の維持費用および微生物汚染の可能性の低下を期待できる。本研究で用いた *S. elongatus* PCC 7942 と *Synechocystis* sp. PCC 6803 は、二酸化炭素固定速度に差はなく(4.58 mmol/gDCW/h および 4.63 mmol/gDCW/h)、PP 経路のフラックスの大きさであったことから(3.17 mmol/gDCW/h および 1.14 mmol/gDCW/h)、PP 経路を遮断することで、増殖速度の回復が見込めると考えられる。

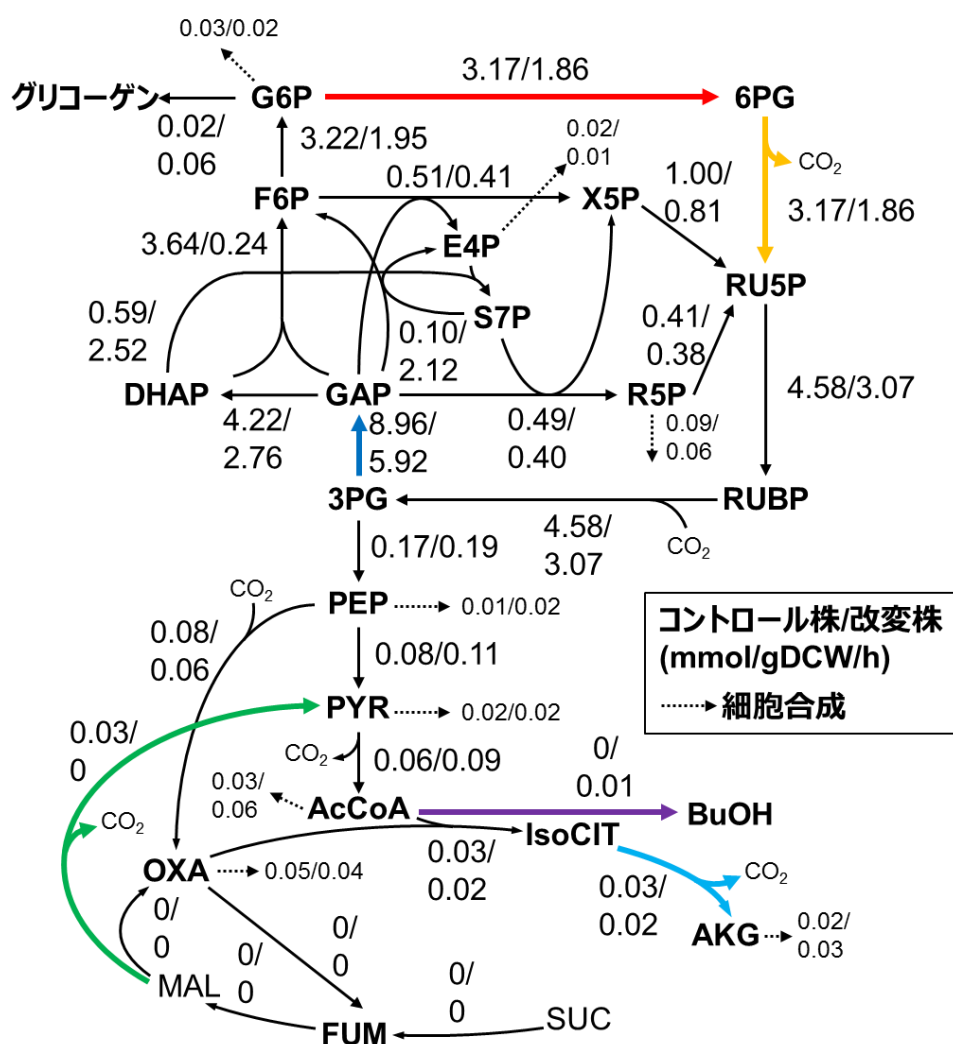


図 3-4 コントロール株および改変株のフラックス分布

代謝物間の矢印は反応の向き、および矢印に付随する数値は各反応のフラックス値を表す。点線の矢印は増殖速度から割り出した細胞合成に必要な代謝物の生産速度を示す。赤、橙、紫、青、水、および緑の矢印は NADPH に関わる反応を示す。なお緑の矢印で示した反応のフラックス値に付随する矢印は反応の方向を示す。

中心代謝経路上の酵素による NADPH 再生および、細胞合成ならびに BuOH 生合成による NADPH 消費の速度バランスを積み上げグラフで図示した(図 3-5)。両株とも消費速度が再生速度を上回っており、中心代謝経路上のフラックスだけでは細胞の恒常性が維持されないことが明らかになった。生産株において、BuOH 生産による NADPH 消費速度 (0.02 mmol/gDCW/h) は全消費速度 (6.4 mmol/gDCW/h) の 0.3%程度であったため、BuOH の生合成が NADPH の酸化還元バランスへ与える影響は微弱であると考えられる。両株共に、全消

費速度の 90%以上はグリセルアルデヒド-3-リン酸(GAP)脱水素酵素(3PG→GAP)の反応で占められていた。この反応は RUBP 再生の初発反応であり、NADPH を還元力として 3PG を GAP へと変換する。そのため、二酸化炭素固定反応のフラックスに依存して NADPH の消費速度が決定される。改変株では二酸化炭素の固定速度が低下していたため、NADPH 再生/消費速度の総計はコントロール株に比べて 66%にまで低下していた(コントロール株;9.7 mmol/gDCW/h、改変株;6.4 mmol/gDCW/h)。NADPH の再生/消費バランスの不均衡状態について、シアノバクテリア特有の機構である光化学系の寄与が考えられる。シアノバクテリアは、光化学系における光エネルギーを用いた水分子の還元反応を介して NADPH および ATP を生産できるため(図 1-3)、中心代謝経路のみによる NADPH 再生/消費の不均衡状態は光化学系によって補填されると考えられる。図 3-5 によると、コントロール株および改変株の光化学系による NADPH 再生は、それぞれ 34%および 40%を占めており、改変株の光合成による NADPH 再生速度は非生産株に比べて約 20%小さくなっていた(コントロール株;3.2 mmol/gDCW/h、生産株;2.6 mmol/gDCW/h)。両株の違いは BuOH の生合成能力の有無であることから、BuOH を生産することで光化学系による NADPH 再生能が低下し、代謝経路上のフラックス値の低下を招いたと考えられる。

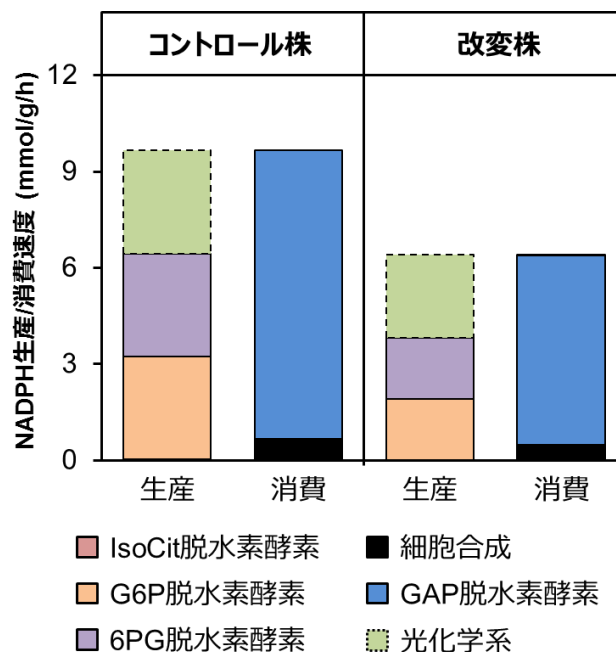


図 3-5 コントロール株および改変株の NADPH の再生/消費バランス

フラックス分布に基づき、細胞内における NADPH の酸化還元速度を積算した。光化学系による NADPH 再生は全体の再生/消費バランスを整えるように機能したと考えられる。

### 3-3-4 光化学系の機能低下の検証

BuOH 生産が光化学系に関するタンパク質群に悪影響を与えたことを検証するため、光化学系関連タンパク質群の発現量の変化を調査した(Uebayashi, 2016 より抜粋)。フラスコで培養した  $OD_{730} \approx 2$  の対数増殖期における細胞を回収し、単位菌体量あたりの光化学系関連タンパク質群の発現量を LC-MS/MS を用いて定量した。光化学系に関するアノテーション付けされている 78 個のタンパク質のうち、23 個のタンパク質が定量できた。このうち、9 個のタンパク質は改変株において有意に低下しており ( $p < 0.05$ )、光化学系 II、チトクロム複合体、およびアンテナタンパク質に集中していた(図 3-6)。光化学系の模式図によると(図 1-3)、光化学系 II は、集光タンパクが捉えた光エネルギーの伝達経路(Z スキーム)の初発反応の触媒酵素群であり、水から電子を引き抜き、酸素およびプロトンを生産する。引き抜かれた電子は Z スキームに従ってチトクロム複合体、光化学系 I、およびフェレドキシンへ順に引き渡され、 $NADP^+$  の還元に使われる。この電子移動の際、チラコイド内腔にプロトンが蓄積される。フェレドキシンによる  $NADP^+$  が還元されると、ストロマ側のプロトンが減少し、チラコイド内腔-ストロマ間でプロトン勾配が生じるため、ATP 合成酵素を介したプロトン勾配の解消に伴う ATP 生産が行われる。光化学系 II のタンパク質量が減少したことは、 $^{13}C$ -MFA の結果から得た、光化学系による  $NADPH$  再生能の低下現象を裏付けている。

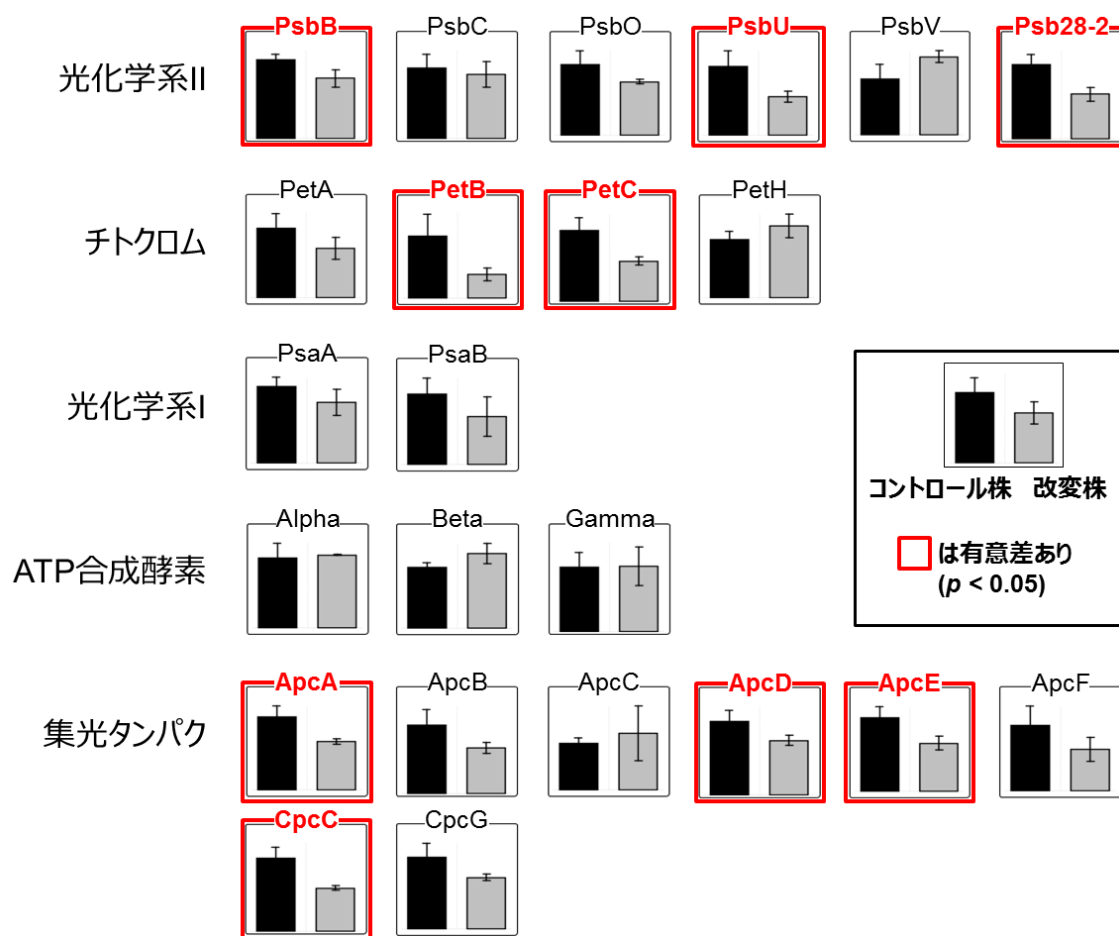


図 3-6 コントロール株および改変株における光化学系に関するタンパク質量の比較

対数増殖期中 ( $OD_{730} \approx 2$ ) における細胞を回収し、各光化学系のタンパク質ごとの量を測定した。有意差があったタンパク質を赤い四角で囲った (t 検定;  $p < 0.05$ )。N = 3 の (平均値) ± (標準偏差) を示す。

また、BuOH 生産が光化学系の活性に悪影響を与えたことを検証するため、最大酸素発生速度の変化を調査した。酸素発生速度は光化学系の初発反応を担う光化学系 II の活性状態に依存して変化するため、光化学系による NADPH の潜在的な生産力について言及できる。明所における酸素発生速度には、呼吸による酸素消費速度も含まれるため、暗所における酸素消費速度を別途測定し、両値を足し合わせることで、光化学系 II の活性量を算出した。蛍光灯付ジャーフェンターで培養した  $OD_{730} \approx 2$  の対数増殖期における細胞を回収し、酸素電極を用いて酸素発生速度を測定した (図 3-7)。改変株の酸素消費速度はコントロールに比べて 64% にまで低下しており (コントロール株;  $35 \mu\text{mol O}_2/\text{g Chl.}/\text{h}$ , 改変株;  $23 \mu\text{mol O}_2/\text{g Chl.}/\text{h}$ )、酸素発生速度は 44% にまで低下していた (コントロール株;  $192 \mu\text{mol O}_2/\text{g Chl.}/\text{h}$ , 改変株;  $84 \mu\text{mol O}_2/\text{g Chl.}/\text{h}$ )。また、改変株のクロロフィル含量はコントロールに比べて 77% にま

で低下していた(コントロール株;12.5  $\mu\text{g/mL}$ 、改変株;9.6  $\mu\text{g/mL}$ )。クロロフィルは捕集した光エネルギーを光化学系 II に伝える役割を担っており、この量が低下することは光化学系全体の活性の低下につながる。これらの結果を統合すると、生産した BuOH がクロロフィル含量および光化学系の活性の低下を誘発し、それに伴い細胞内の NADPH 再生力が低下したことで、二酸化炭素固定のための還元力の不足状態に陥り、細胞合成速度の低下を招いたと考えられる。

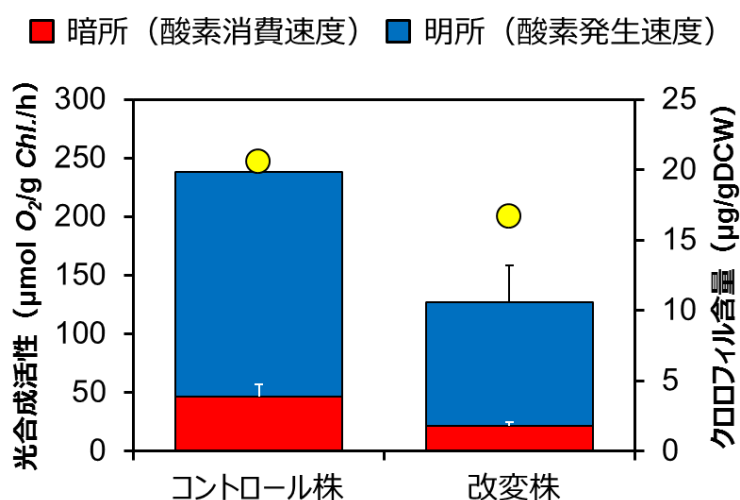


図 3-7 コントロール株および改変株における酸素発生速度の比較

対数増殖期中 ( $\text{OD}_{730} \approx 2$ ) における細胞を回収し、飽和光照射下 ( $1,000 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) における酸素発生速度およびクロロフィル含量を測定した。赤棒が酸素消費速度、青棒が明所における正味の酸素発生速度(酸素消費速度を含む)を示す。光培養リアクターおよび解析の都合上、1つの培養液から同時点の細胞の  $N=3$  のデータを示す。

### 3-4 結言

本章では、BuOH を生産する *S. elongatus* PCC 7942 の生育速度が低下した原因、および BuOH の効率的な生産に有効な代謝改変箇所の特特定を目的とし、BuOH 生産株および非生産株に対して安定同位体非定常期における  $^{13}\text{C}$ -MFA を行った(図 3-8、課題1)。両株の中心代謝経路上のフラックス分布を算出したところ、生産株において二酸化炭素の固定反応のフラックスが低下していた(図 3-4)。また、両株共に、二酸化炭素固定反応の前駆体である RUBP の再生には PP 経路を用いていた(図 3-4)。PP 経路では二酸化炭素を放出する反応を伴うため、この経路を使用することは固定した二酸化炭素が損失し、細胞合成に使用できる炭素が減少することを意味する。また、中心代謝経路上のフラックス分布から算出した補酵素の酸化還元速度のバランスは、両株とも還元速度よりも酸化速度の方が大きかった(図 3-5)。シ

シアノバクテリアは NADPH の再生反応として、中心代謝経路以外に光化学系を有するため、酸化および還元速度の差は光化学系によって補填されたことを明らかにした(図 3-5)。光化学系による NADPH 再生速度は生産株よりも非生産株の方が小さく、光化学系の機能の低下が定量的に見積もられた(図 3-5)。

$^{13}\text{C}$ -MFA で得られた光化学系に関する示唆を実験的に確認するため、プロテオーム解析および酸素発生速度測定を採用した(図 3-8、課題2)。プロテオーム解析を用いて光化学系に関わるタンパク質量を一斉定量したところ、光化学系 II、集光タンパク、およびチトクロムのタンパク質量が有意に減少していることを明らかにした(図 3-6)。さらに、光化学系 II の機能を評価するため、酸素発生速度を測定したところ、BuOH 生産株では光合成活性が低下していることを明らかにした(図 3-7)。これらの結果は、生産した BuOH が光化学系の機能低下に寄与していることを示している。

$^{13}\text{C}$ -MFA の結果、本研究で扱った BuOH 生産株では、BuOH 生産に起因する光化学系の NADPH 再生の低下が示唆された。この示唆を実験的に確認するため、光化学系のタンパク質量、および光合成活性を対象とした解析手法に着目し、それぞれプロテオーム解析および酸素発生速度測定を初めて採用した。中心代謝経路を評価できる  $^{13}\text{C}$ -MFA とこれらの手法とを組み合わせることで、光化学系も含めたシアノバクテリアの代謝システムの評価、および包括的な理解が可能になった。特に、酸素発生速度の測定は、光化学系による NADPH 再生速度の概算に使用できることから、光化学系の定量的な測定に寄与すると考えられる。そこで、これらの実験結果を統合し、BuOH 生産株の細胞内で生じた代謝変化の機序の推定、および BuOH の高生産化に向けた代謝改変戦略を立案した(図 3-8、課題3)。

本研究で明らかにした、二酸化炭素を単一炭素源とする *S. elongatus* PCC 7942 のフラックス分布によると、EMP 経路上流および CBB 回路のフラックスが大きく、EMP 経路下流および TCA 回路のフラックスが小さかった。この特徴は異属のシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の  $^{13}\text{C}$ -MFA の結果とも一致しており(Young *et al.*, 2011、You *et al.*, 2014、Nakajima *et al.*, 2014、Nakajima *et al.*, 2017)、二酸化炭素を炭素源とする生物に共通する特徴であると言える。BuOH の生産には、前駆体として EMP 経路下流に位置している AcCoA を要求する。すなわち、シアノバクテリアによる BuOH 生産は本来シアノバクテリアが不得意とする代謝経路上の代謝物を生合成しなければならず、このことが大腸菌などの他の生物と比べて生産速度が低い原因であると考えられる。従って、二酸化炭素の固定速度の維持に必要な CBB 回路へのフラックスを残しつつ、EMP 経路下流へのフラックスを増大させるような遺伝子改変あるいは育種を行うことがシアノバクテリアによる BuOH 生産速度の向上に有効であると考えられる。また、*S. elongatus* PCC 7942 は *Synechocystis* sp. PCC 6803 に比べて PP 経路のフラックスが大きかつ

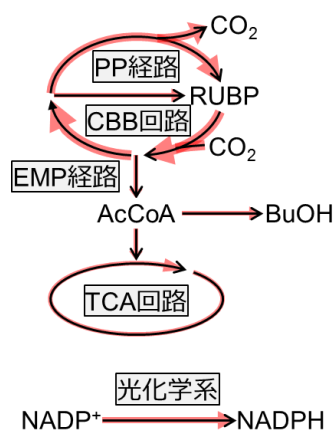
た。PP 経路には二酸化炭素の排出を伴う反応が含まれているため、この経路を遮断し、炭素の損失を防ぐことが BuOH 生産速度の向上に寄与すると考えられる。

BuOH などの有機溶媒は、細胞膜および酵素タンパク質の疎水性相互作用を弱めるため (Vollherbst-Schneck *et al.*, 1984, Bowles and Ellefson, 1985)、増殖および有機溶媒生産能力に対して悪影響を与えることが知られている。BuOH 生産株では、BuOH を生産することで光化学系のタンパク質量が低下し、確保できるはずの NADPH が低下したため、二酸化炭素固定速度の低下に伴う生育速度の低下が生じた。従って、生産株の BuOH 生産効率の向上に向けて、光化学系による NADPH 再生速度の回復を指向した光化学系関連の遺伝子発現の強化が有効であると考えられる。また、大腸菌に *C. acetobutylicum* 由来の分子シャペロン *groESL* 遺伝子を発現させることで BuOH 耐性の向上に成功した例が報告された (Abdelaal *et al.*, 2015)。他方、実験室進化によって得られたイソブタノール耐性株から見出された *envD* 遺伝子の変異体は、細胞内の有機溶媒の排出機能を担っており、BuOH に対しても耐性を示すことが報告された (Matsusako *et al.*, 2017)。上記の例の様な、BuOH によって変性したタンパク質のフォールディングの回復、あるいは細胞内の BuOH 濃度の縮減に関する知見は、*S. elongatus* にも応用できるかもしれない。

### 課題 1

BuOH 生産株の代謝状態を明らかにする  
(<sup>13</sup>C-MFA)

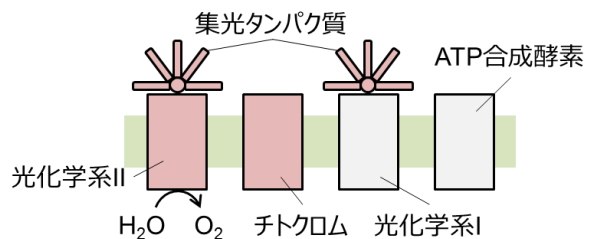
- 主に PP 経路を介して RUBP を再生していた
- 二酸化炭素固定速度が低下した
- 光化学系による NADPH 生産速度が低下した



### 課題 2

BuOH 生産株で生じた変化を突き止める  
(プロテオーム解析、酸素発生速度測定)

- 生産株において、光化学系関連のタンパク質量が低下し (赤部分)、それに伴い光合成活性が低下した



### 課題 3

BuOH の高生産化に向けた代謝改変戦略を立案する

- PP 経路を遮断する
- EMP 経路下流へのフラックスを強化する
- 光化学系関連のタンパク質の発現を強化する

図 3-8 本章の概要

## 第4章 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の直線的電子伝達経路の稼働率の解明

### 4-1 緒言

第3章において、シアノバクテリアに対して  $^{13}\text{C}$ -MFA および酸素発生速度測定を組み合わせることで、中心代謝経路に加えて、光化学系が NADPH 再生に与える影響を評価できるようになった。また、光化学系による NADPH 再生速度の低下は増殖速度および二酸化炭素固定速度の低下の原因になり得ることを明らかにした。このことは、シアノバクテリアでは中心代謝経路および光化学系の双方が NADPH の再生/消費に対して密接に関与していることを意味している。そこで第4章では、NADPH の再生/消費のバランスに与えた摂動がシアノバクテリアの代謝に与える影響の解明を目指した。

シアノバクテリアは酸素発生型の光合成を行う微生物を指し、大気中の二酸化炭素を単一炭素源として生育および物質生産できる。二酸化炭素固定は CBB 回路と称される、光合成を行う微生物に特徴的な中心代謝経路を介して行われる。シアノバクテリアを用いた物質生産において、二酸化炭素の固定速度が向上することは増殖速度および目的化合物の生産速度の向上につながる。CBB 回路では還元力として NADPH を消費し、光合成機能を担う光化学系では NADPH を生産するため、光合成活性を向上させることで CBB 回路の回転率の向上による増殖速度および二酸化炭素固定速度の向上が期待できる。一方、還元力過多の細胞は増殖に好ましくなく (Sauer *et al.*, 2004)、CBB 回路の駆動に必要な NADPH は消費あるいは追加生産を停止する必要がある。先行研究において、シアノバクテリアの呼吸鎖複合体の一部を形成する *ndhF* 遺伝子の破壊株が構築された (Ogawa *et al.*, 2013)。呼吸鎖に関するタンパク質複合体 Ndh は NADPH を消費して ATP を生産することが知られている (Ogawa and Mi, 2007)。また、この株では増殖速度の低下が確認されており、それに伴い二酸化炭素の固定速度が低下していることが予想される。このことは CBB 回路の駆動に必要な NADPH の量が低下し、かつ NADPH 消費のための *ndhF* 遺伝子をもたないため、細胞内において還元力過多の状態に陥っていると考えられる。

シアノバクテリアの光化学系における NADPH 再生システムについて、関連するタンパク質および電子の流れを示した (図 4-1)。水から引き抜かれた電子は 3 種類の経路を用いて伝達される。直線的電子伝達経路は、 $\text{NADP}^+$  に電子を受け渡して NADPH および ATP を生産する経路であり、Z スキームとして知られている。それに対し、循環的電子伝達経路および水-水回路は、それぞれプラストキノン、および酸素に電子を受け渡して ATP を生産する経路である。

循環的電子伝達経路および水-水回路は NADPH の再生を回避して ATP を生産できるため、直線的電子伝達経路と併せて、環境条件によって変動する ATP および NADPH の要求を満たすように機能することが知られている (Backhausen *et al.*, 2000、Heber, 2002)。そこで本研究では、 $^{13}\text{C}$ -MFA で明らかにした NADPH 生産/消費速度の収支と酸素発生速度の測定による NADPH 生産速度の情報を組み合わせ、*ndhF* 遺伝子破壊株における直線的電子伝達経路の稼働率の解明を目指した。

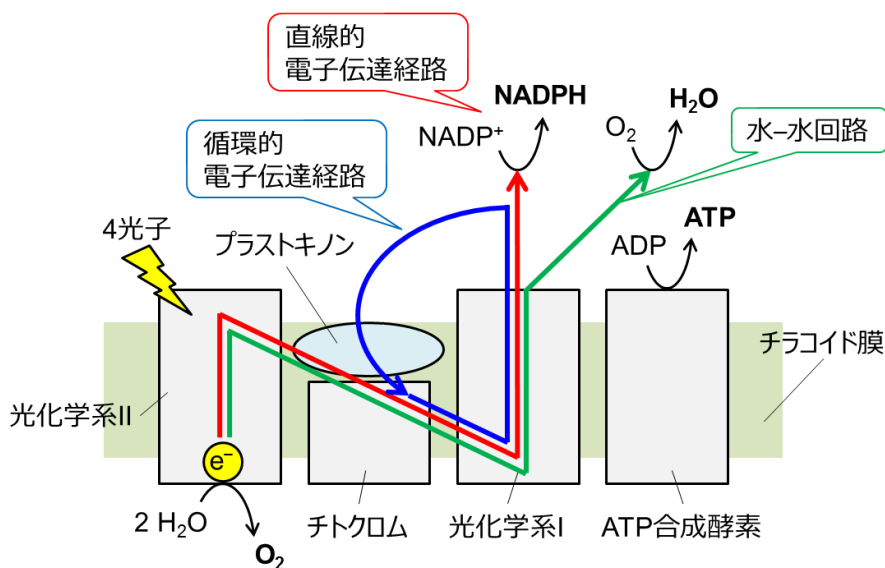


図 4-1 光化学系における電子伝達経路

シアノバクテリアの光化学系における電子伝達の概要図。光化学系 II において水から引き抜かれた電子はチトクロムを経由して光化学系 I に伝達される。その後、電子は、 $\text{NADP}^+$  に受け渡す直線的電子伝達経路 (赤)、プラストキノンに受け渡す循環的電子伝達経路 (青)、および酸素に受け渡す水-水回路 (緑) に分岐して伝達される。電子が循環的電子伝達経路および水-水回路に渡った場合、NADPH の再生を回避できる。

本章の目的において、グルコースを含む培地においても遺伝子破壊による NADPH による還元力過多の状態が変化しないことが予想されたため、計算コストが少ない安定同位体定常解析を採用した。また、光化学系の変化を明らかにするため、酸素発生速度の測定を併せて行い、中心代謝経路および光化学系が NADPH の再生/消費速度のバランスに与える影響を調査した。また、本博士論文では独立栄養生物であるシアノバクテリアに共通した知見を得ることを目的としているため、第3章で用いた *Synechococcus* 属とは異なるシアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 を対象とした。両者共に酸素発生型の光合成を行い、光合成研究および有用物質生産のモデル生物として使用されている (Ikeuchi and Tabata, 2001、

Angermayr *et al.*, 2015)。光化学系はシアノバクテリアに共通する機構であるため、本章で得られた結果は第3章、ひいてはシアノバクテリアに対してフィードバックできる知見が得られると考えられる。

## 4-2 実験材料および実験方法

### 4-2-1 培地組成および使用菌株

培養には改変 BG-11 培地(合成培地;1.5 g/L 硝酸ナトリウム、27 mg/L 塩化カルシウム・2水和物、4.5 mg/L 塩化鉄(II)・4水和物、1.2 mg/L 塩化アンモニウム、1 mg/L エチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸二ナトリウム塩・2水和物、31 mg/L リン酸水素二カリウム、75 mg/L 硫酸マグネシウム・7水和物、2.9 mg/L ホウ酸、1.8 mg/L 塩化マンガン(II)・4水和物、0.22 mg/L 硫酸亜鉛・7水和物、0.39 mg/L モリブデン酸ナトリウム・2水和物、79 µg/L 硫酸銅・5水和物、49 µg/L 塩化コバルト(II)・6水和物、4.2 g/L 炭酸水素ナトリウム、および 20 mM ヒドロキシエチルピペラジジエタンスルホン酸-水酸化カリウム緩衝液;pH 7.5)。固体培地は 15 g/L 寒天を含む。必要に応じて、グルコースおよびエリスロマイシンをそれぞれ 0.9 g/L および 20 mg/L になるように添加した。

本研究では、グルコース耐性を示す *Synechocystis* sp. PCC 6803(コントロール)株およびその派生の株(呼吸鎖複合体 *ndhF* 遺伝子破壊株)を用いた(Ogawa *et al.*, 2013)。Ndh 複合体は、NADPH を酸化した際に放出されるプロトンをも膜外に汲み出すことで生じたプロトン勾配を利用して ATP を生産する機能を担う。

### 4-2-2 細胞濁度および乾燥菌体重量測定

経時的に培養液を回収し、分光光度計(UVmini-1240;Shimadzu)を用いて、培養液の 730 nm における濁度(OD<sub>730</sub>)を測定した。乾燥菌体重量を測定するため、OD<sub>730</sub> ≈ 1 の培養液 25 mL をろ過し、0.9% 食塩水を用いて洗浄した後、フィルターごと 70°C で十分乾燥させた。乾燥したフィルターの重量を測定し、乾燥菌体重量(gDCW/L/OD<sub>730</sub>)を算出した。

### 4-2-3 培養条件

冷凍保存菌体を改変 BG-11 固体培地に塗布後 30°C、100 µE/m<sup>2</sup>/s で培養し、コロニーを単離した。前培養として、改変 BG-11 液体培地 20 mL を入れた 100 mL エルレンマイヤーフラスコにコロニーを植菌し、OD<sub>730</sub> ≈ 1 になるまで 30°C、100 µE/m<sup>2</sup>/s で振とう培養した。生育特性評価の本培養において、グルコースおよび炭酸水素ナトリウムを含んだ改変 BG-11 液体培地 20 mL を入れた 100 mL エルレンマイヤーフラスコに初期 OD<sub>730</sub> = 0.05 になるように植菌し、30°C、

100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  で培養した。 $^{13}\text{C}$ -MFA の本培養において、[1,2- $^{13}\text{C}$ ]グルコースおよび炭酸水素ナトリウムを含む改変 BG-11 液体培地 100 mL を入れた 500 mL エルレンマイヤーフラスコに初期  $\text{OD}_{730} = 0.05$  になるように植菌し、30°C、50  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  で培養した。光量子束密度は光量子計 (LI-250A、LI-190SA; メイワフォーシス) を用いて測定した。

#### 4-2-4 培地成分の測定

経時的に培養液を回収し、18,000  $\times g$ 、5 分間、4°C で遠心分離した。上清は 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルター (Millex HV; Merck KGaA) でろ過し、使用するまで -30°C で保存した。グルコース検出用の酵素電極を配したバイオセンサー (BF-5i; 王子計測) を用いて、培地上清に含まれるグルコース濃度を定量した。

#### 4-2-5 GC-MS による $^{13}\text{C}$ 標識割合の測定

2-2-5 に記載した方法でサンプルを処理および分析した。

#### 4-2-6 安定同位体定常状態における $^{13}\text{C}$ -MFA

$^{13}\text{C}$ -MFA に利用する質量分析データのハンドリング、代謝モデルの構築、実験で得られた各代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合を説明するフラックス分布の推定、および各フラックスの 95% 信頼区間の算出には OpenMebius (Kajihata *et al.*, 2014) を用いた。代謝物質中に天然の割合で存在する炭素、水素、酸素、窒素、およびケイ素の同位体の影響は先行研究の方法に従って除去した (van Winden *et al.*, 2002)。シアノバクテリアの中心代謝経路モデルには、CBB 回路、EMP 経路、PP 経路、グリオキシル酸経路、TCA 回路、補充経路、および C1 代謝が含まれる。増殖のために必要な細胞構成成分の前駆体の要求フラックスは乾燥菌体量当たりの前駆体量の文献値に比増殖速度の実験値を乗じて算出した (Young *et al.*, 2011)。コントロール株および改変株の MID の標準偏差はそれぞれ 0.01 および 0.012 とした。各代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合は EMU を用いて計算した (Antoniewicz *et al.*, 2007b)。MATLAB が提供する非線形最適化ソルバー *fmincon* を利用し、式 4-1 の目的関数が最小となるフラックス分布を探索した。

$$RSS = \sum_{\text{metabolite}} \left\{ \sum_{i=0}^n \{MID_{\text{exp}}(M+i) - MID_{\text{sim}}(M+i)\}^2 \right\} \quad (\text{式 4-1})$$

#### 4-2-7 酸素発生速度の測定

3-2-6 に記載した方法でクロロフィル含量の測定および光合成活性を測定した。

## 4-3 結果および考察

### 4-3-1 生育特性の評価

野生型(コントロール)株および *ndhF* 遺伝子破壊(改変)株を用い、両株の代謝の違いを明らかにした。*ndhF* 遺伝子は膜上に存在する呼吸鎖に関するタンパク質複合体の一部をコードしており、この複合体は NADPH を還元力としてして ATP を生産する(図 4-2)。両株は、グルコースおよび二酸化炭素を炭素源とした 20 mL 改変 BG-11 液体培地で  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  の照光下で好氣的に回分培養した。

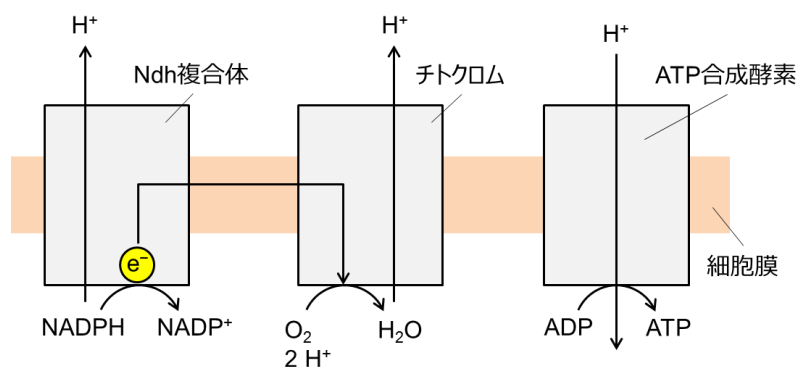


図 4-2 呼吸鎖に関わるタンパク質群による ATP 生産機構

呼吸鎖複合体 Ndh および呼吸鎖関連タンパク質複合体の電子伝達機構。本章で対象とした *ndhF* 遺伝子破壊株は、Ndh 複合体のうち NdhF を欠損しているため、呼吸鎖による NADPH 消費および ATP 生産ができない。

両株の細胞増殖曲線およびグルコース濃度変化を図 4-3 に、生育特性(比増殖速度、グルコース比消費速度、およびクロロフィル含量)値を表 4-1 に示した。グルコース非消費速度について、両株で差は見られなかった(コントロール株;  $0.24 \text{ mmol}/\text{gDCW}/\text{h}$ 、改変株;  $0.22 \text{ mmol}/\text{gDCW}/\text{h}$ )の生産が見られた。一方、 $\text{OD}_{730} \approx 2$  付近の対数増殖期における増殖速度について、改変株はコントロール株よりも有意に小さかった(コントロール株;  $0.09 \text{ 1}/\text{h}$ 、改変株;  $0.06 \text{ 1}/\text{h}$ )。クロロフィル含量について、改変株はコントロール株よりも有意に小さく、クロロフィル含量の低下に伴うシアノバクテリア特有の緑色の退色が確認された(図 4-3B)。生育速度が低下した理由について、*ndhF* 遺伝子の破壊による NADPH の再生/消費速度のバランスの変化が代謝システムに悪影響を与えた可能性がある。この仮説を検証するため、<sup>13</sup>C-MFA を行い、細胞内の炭素の流れを明らかにした。

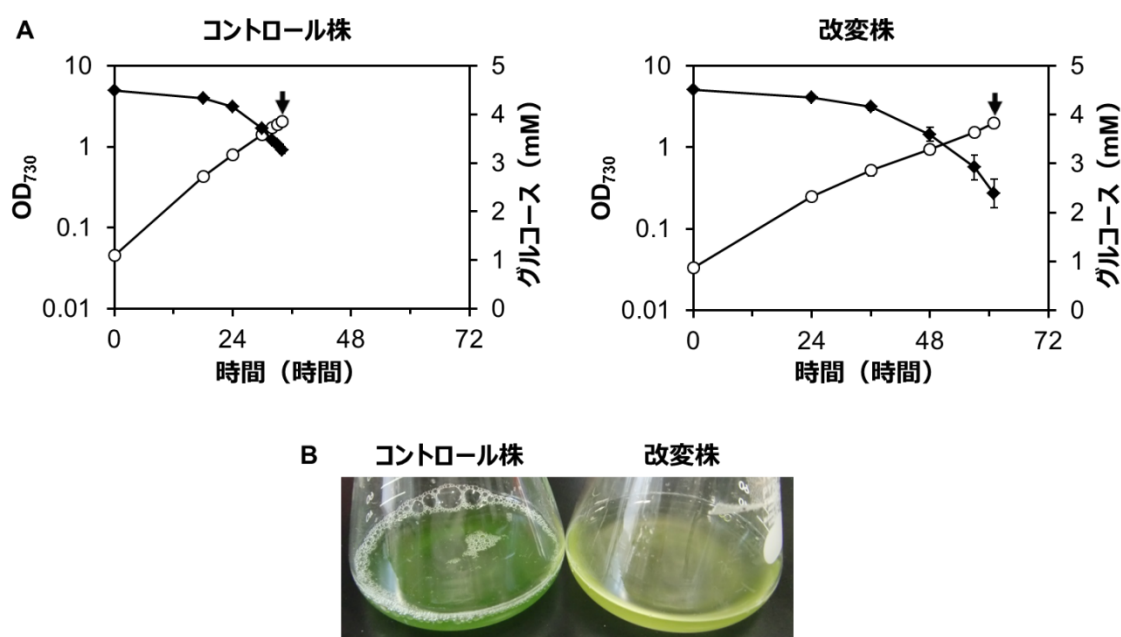


図 4-3 コントロール株および改変株の培養挙動

[1,2-<sup>13</sup>C]グルコースおよび二酸化炭素を炭素源とする培地において好気条件で回分培養した。(A) 生育過程の培養液の変化。データは N = 4 の(平均)±(標準偏差)を示す。○は細胞濁度、◆はグルコース濃度、黒矢印は <sup>13</sup>C-MFA 用の細胞回収点を示す。(B) 培養液の色の違い。

表 4-1 コントロール株および改変株の生育特性

株名	増殖速度 (1/h)	グルコース比消費速度 (mmol/gDCW/h)	クロロフィル含量 (μg/gDCW)
コントロール株	0.09 ± 0.00	0.24 ± 0.01	6.47 ± 0.26
改変株	0.06 ± 0.00	0.22 ± 0.01	2.98 ± 0.43

データは N = 4 の(平均)±(標準偏差)を示す。

#### 4-3-2 各中間代謝物の <sup>13</sup>C 標識割合の測定

コントロール株および改変株のフラックス分布を <sup>13</sup>C-MFA で求めた。[1,2-<sup>13</sup>C]グルコースおよび炭酸水素ナトリウムを含む改変 BG-11 で培養した OD<sub>730</sub> ≈ 2 の対数増殖期における細胞を回収し、抽出したタンパク質由来アミノ酸中の <sup>13</sup>C 標識割合を GC-MS で測定した。フラックス分布の推定に用いたアミノ酸フラグメントの情報は先行研究で用いたものを参考にした(表 4-2, Antoniewicz *et al.*, 2007a)。代謝モデルならびに <sup>13</sup>C 標識割合の実測値および推定値は付録表 4-2 に示した。代謝モデルには、CBB 回路、EMP 経路、PP 経路、補充経路、TCA 回

路、グリオキシル酸経路、および BuOH 生合成経路が含まれている。代謝モデルの自由度、独立データ数、および  $\chi$  二乗検定の閾値は、それぞれ 20、71、69 であり、両株とも  $\chi$  二乗検定を通過した(コントロール株;44、改変株;56、 $\alpha = 0.05$ )。これは、推定したフラックス分布は、統計的に測定した各代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合を説明していることを意味する。

表 4-2 フラックス分布の推定に用いたアミノ酸フラグメント

	Ala	Asp	Glu	Phe	Gly	Ile	Leu	Ser	Thr	Val	Tyr
57	○	○	○		○			○	○	○	
85	○	○	○		○	○	○	○	○	○	
157		○	○			○		○			
302		○									○

安定同位体定常期であることを確認するため、 $\text{OD}_{730} \approx 2$  前後の細胞を回収し、 $^{13}\text{C}$  標識割合を測定した。全ての代謝物について、安定同位体定常状態が確認できた。一部のアミノ酸について示した(図 4-4)。IPTG 添加による著しい代謝の変動を伴う第2章の解析とは異なり、本章では  $\text{OD}_{730} \approx 2$  の1点のみで細胞を回収し、フラックス分布を推定した。

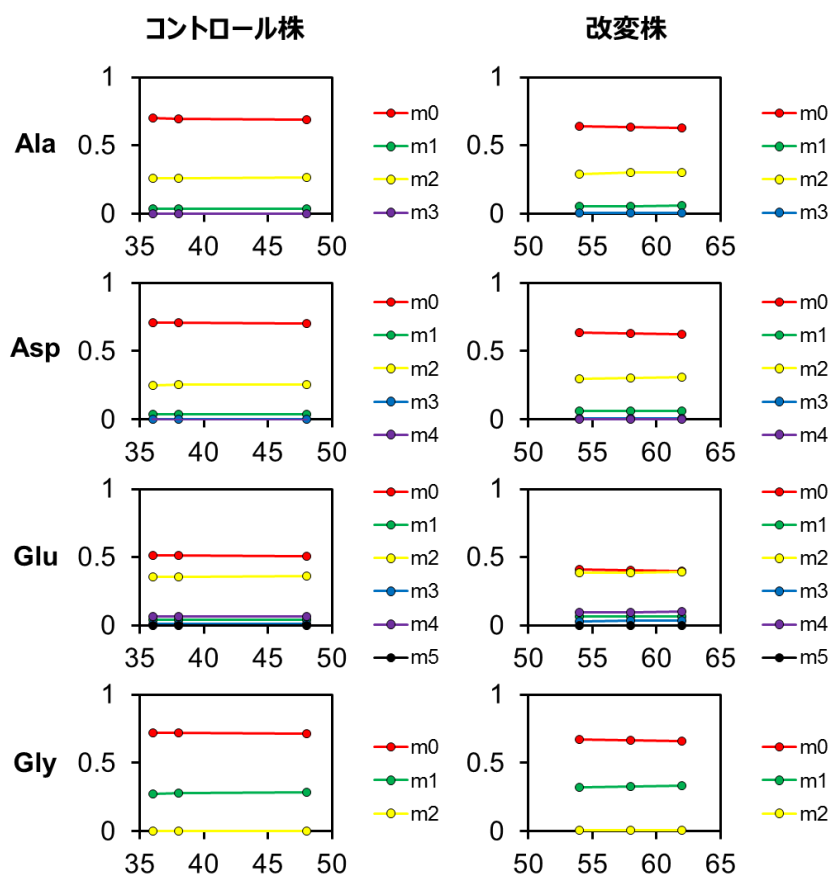


図 4-4 コントロール株および改変株から抽出した一部のアミノ酸の  $^{13}\text{C}$  標識割合の遷移  
アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびグリシンの M-57 フラグメントの  $^{13}\text{C}$  標識割合。  
縦軸は  $^{13}\text{C}$  標識割合、横軸は培養開始からの経過時間を示す。中点が  $\text{OD}_{730} \approx 2$  にあたり、 $^{13}\text{C}$ -MFA のデータとして用いた。

#### 4-3-3 コントロール株および改変株の代謝フラックス分布の比較

両株の代謝フラックスの最良適合値は、 $^{13}\text{C}$  標識割合の実験値およびモデルから予想されたシミュレーション値の残差二乗和を最小化することで推定した。各反応の最良適合値(代謝フラックスの絶対値;  $\text{mmol/gDCW/h}$ )は、代謝経路上に図示した(図 4-5)。

両株とも二酸化炭素を固定するため、EMP 経路上流および CBB 回路のフラックスが大きく、代謝経路の分岐点におけるフラックスの分岐比は一部を除いて顕著な差は見られなかった。コントロール株のフラックス分布は先行研究の値と類似しており(You *et al.*, 2014)、解析結果の妥当性が認められた。二酸化炭素固定速度について、改変株はコントロール株に比べて減少していた(コントロール株;  $3.24 \text{ mmol/gDCW/h}$ 、改変株;  $0.95 \text{ mmol/gDCW/h}$ )。また、第3章で扱った *Synechococcus* 属とは異なり、PP 経路由来の RUBP の再生フラックスは小さかった(PP 経路/二酸化炭素固定、*Synechocystis*;  $0.06/3.24$ 、*Synechococcus*;  $3.17/4.58$ )。このことは、

取り込んだ炭素を細胞外に漏らすことなく有効に利用できていることを意味するため、効率よい代謝状態であると言える。赤字で示した代謝経路上のフラックスは、それぞれの中間代謝物 (F6P、DHAP、GAP、S7P、および E4P) の生合成では炭素骨格移動によるフラックス情報の蓄積がないため、フラックス値を一意に決めることができない (Nakajima *et al.*, 2014)。

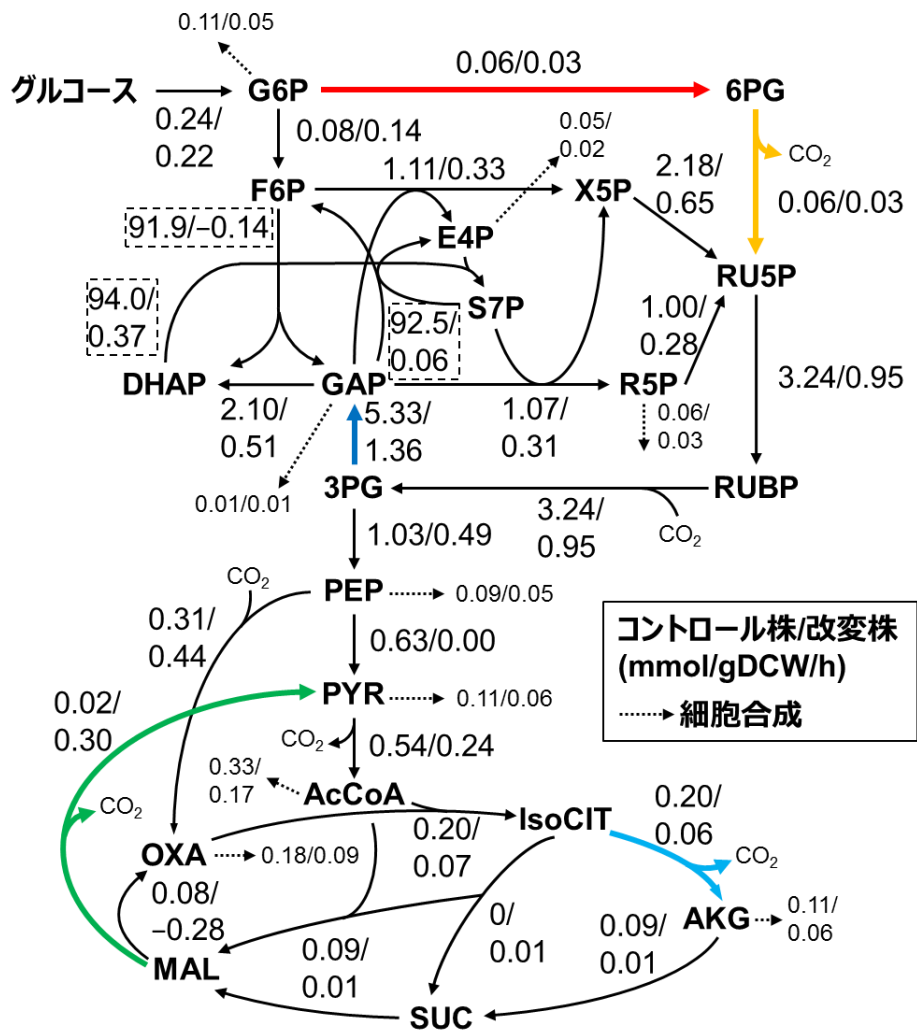


図 4-5 コントロール株および改変株のフラックス分布

代謝物間の矢印は反応の向き、および矢印に付随する数値は各反応のフラックス値を表す。点線の矢印は増殖速度から割り出した細胞合成に必要な代謝物の生産速度を示す。赤、橙、紫、青、水、および緑の矢印は NADPH に関わる反応を示す。なお緑の矢印で示した反応のフラックス値に付随する矢印は反応の方向を示す。マイナスの付いたフラックス値は矢印とは逆方向に反応が進む。点線で囲ったフラックスは炭素移動による追跡ができないため不定となる。

中心代謝経路上の酵素および細胞合成による NADPH 再生および消費の速度バランスを積み上げグラフで図示した(図 4-6)。両株とも消費速度が再生速度を上回っており、中心代謝経路上のフラックスだけでは細胞の恒常性が維持されないことが明らかになった。第3章の結果と同じく、全消費速度の大半がグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(3PG→GAP)の反応で占められていた(図 4-6、コントロール株;76%、改変株;63%)。この反応は RUBP 再生の初発であり、NADPH を還元力として 3PG を GAP へと変換するため、シアノバクテリアの生育に必須である。改変株では二酸化炭素の固定速度の低下に伴いグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の反応のフラックスも低下したため、NADPH 再生/消費速度の総計はコントロール株に比べて 66%にまで低下していた(図 4-6、コントロール株;7.0 mmol/gDCW/h、改変株;2.2 mmol/gDCW/h)。シアノバクテリアは中心代謝経路以外に NADPH を生産できる機能である光化学系を有する。一般に、シアノバクテリアは細胞合成に必要な NADPH を中心代謝経路だけでなく光化学系でも生産するため、中心代謝経路のみによる NADPH 再生/消費の不均衡状態は光化学系によって補填されると考えられる。図 4-6 によると、両株の光化学系による NADPH 再生はそれぞれ 94%および 81%を占めており、改変株の光合成による NADPH 再生速度は非生産株に比べて約 70%小さくなっていた(コントロール株;6.6 mmol/gDCW/h、生産株;1.8 mmol/gDCW/h)。両株の違いは NADPH を消費する *ndhF* 遺伝子の有無であることから、細胞内に蓄積された NADPH が代謝システムに何らかの悪影響を与えたことにより、二酸化炭素固定反応のフラックスおよび増殖速度の低下を招いたと考えられる。

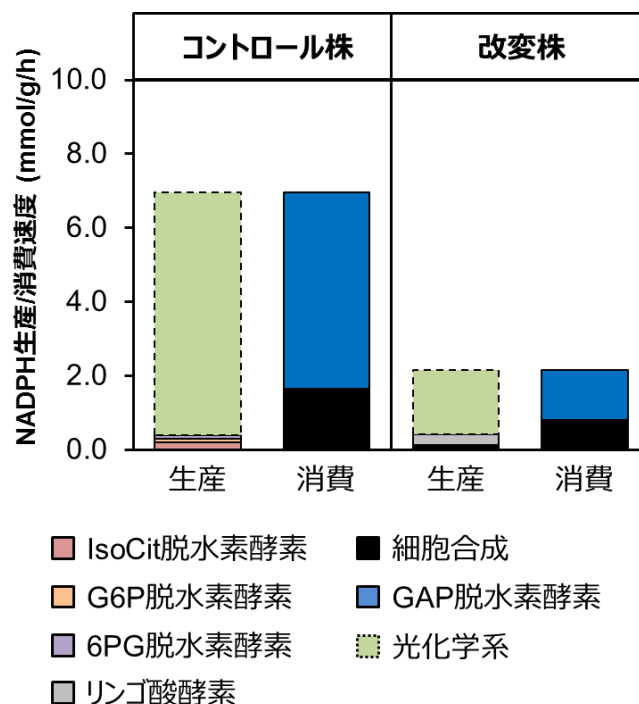
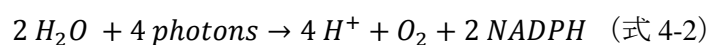


図 4-6 コントロール株および改変株の NADPH の再生/消費バランス

フラックス分布に基づき、細胞内における NADPH の酸化還元速度を積算した。光化学系による NADPH 再生は全体の再生/消費バランスを整えるように機能したと考えられる。

#### 4-3-4 酸素発生速度の測定

補酵素バランスによって明らかにした光合成活性の大きさの違いを実験的に検証するため、酸素発生速度の変化を調査した。補酵素バランスによると、改変株はコントロール株よりも光合成活性が小さくなることが予想される。明所における酸素発生速度には、呼吸による酸素消費速度も含まれるため、暗所における酸素消費速度を別途測定し、両値を足し合わせることで、光化学系 II の活性量を算出した。フラスコで培養した  $OD_{730} \approx 2$  の対数増殖期における細胞を回収し、酸素電極を用いて酸素発生速度を測定した(図 3-7)。改変株の酸素消費速度はコントロールに比べて 2.3 倍程度向上しており(コントロール株;  $36 \mu\text{mol } O_2/\text{g } Chl./\text{h}$ 、改変株;  $84 \mu\text{mol } O_2/\text{g } Chl./\text{h}$ )、酸素発生速度は 1.3 倍程度向上していた(コントロール株;  $309 \mu\text{mol } O_2/\text{g } Chl./\text{h}$ 、改変株;  $408 \mu\text{mol } O_2/\text{g } Chl./\text{h}$ )。一般に、光化学系による直線的電子伝達系は(図 4-1)、以下の式に従って酸素および NADPH が生産される(式 4-2)。



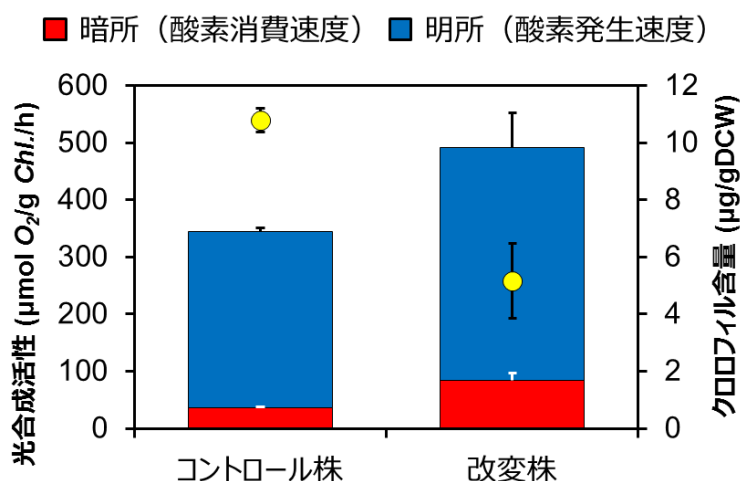


図 4-7 コントロール株および改変株における酸素発生速度の比較

対数増殖期中 ( $OD_{730} \approx 2$ ) における細胞を回収し、飽和光照射下 ( $1,000 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) における酸素発生速度およびクロロフィル含量を測定した。赤棒が酸素消費速度および青棒が正味の酸素発生速度を示す。データは  $N = 4$  の (平均)  $\pm$  (標準偏差) を示す。

この際、酸素発生速度は右辺の  $O_2$  を測定しているため、NADPH の再生速度を見積もることができる (表 4-3)。図 4-7 では改変株の酸素発生速度の方がコントロール株よりも大きく見積もられたのに対し、表 4-3 では改変株の NADPH 再生速度の方がコントロール株よりも小さく見積もられた。この違いは、光合成活性は酸素発生速度をクロロフィル含量で割っているのに対し、NADPH 再生速度は乾燥菌体重量で割っていることに由来する。細胞内の単位菌体量あたりのクロロフィル含量は、改変株の方が小さいことが示された (表 4-1)。すなわち、改変株では、単位クロロフィルあたりの光合成への利用効率が向上したことを意味している。

また、コントロール株の場合、酸素発生速度および  $^{13}\text{C}$ -MFA の結果から見積もった、光化学系による NADPH 再生速度は、それぞれ  $6.98 \text{ mmol}/\text{gDCW}/\text{h}$  および  $6.56 \text{ mmol}/\text{gDCW}/\text{h}$  であった (表 4-3)。 $^{13}\text{C}$ -MFA の結果から見積もられた NADPH 再生速度は、細胞内における正味の再生速度を示すため、酸素発生速度から見積もられた NADPH 再生速度の一部を利用することで細胞の要求を満たしていると考えられる。 $^{13}\text{C}$ -MFA および酸素発生速度による NADPH 再生速度を元に、細胞内で使用されている直線的電子伝達経路の稼働率を算出したところ、水から得た電子のうち少なくとも 94% がこの経路に流れることを明らかにした (図 4-8)。図 4-7 の酸素発生速度の値は飽和光照射下 ( $1,000 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) のものであり、培養条件における光強度 ( $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) と異なるため、培養条件下の酸素発生速度とは異なる可能性がある。しかし、酸素発生速度は光強度に比例して大きくなる性質があるため、本研究を通して直線的電子伝達経路の稼働率の最小値を明らかにできたと言える。

一方、改変株では、酸素発生速度および  $^{13}\text{C}$ -MFA の結果から見積もった光化学系による NADPH 再生速度はそれぞれ 4.78 mmol/gDCW/h および 1.75 mmol/gDCW/h であり(表 4-3)、直線的電子伝達系のみを使用した場合、細胞内が還元力過多になることを明らかにした(図 4-8)。同様に直線的電子伝達経路の稼働率を計算したところ、改変株では、水から得た電子のうち少なくとも 37%がこの経路に流れることを明らかにした(図 4-8)。改変株において直線的電子伝達経路の稼働率が低下した現象について、呼吸鎖遺伝子の破壊によって NADPH の消費速度が低下した細胞では、直線的電子伝達経路による NADPH の再生速度を低下させることで、還元力過多の状態を回避したと考えられる。直線的電子伝達経路に流れなかった電子は、循環的電子伝達経路あるいは水-水回路などが用いられた可能性がある(図 4-1)。これらの電子伝達経路は、電子伝達に伴うプロトン勾配の形成を介して ATP は生産できるものの、NADPH は再生されないため、細胞内の ATP/NADPH 比の調整に関与していることが知られている(Backhausen *et al.*, 2000, Heber, 2002)。これらの機構の生理条件下における寄与率を実験的に測定する手法は確立されているため(Asada and Badger, 1984, Miyake *et al.*, 2010)、これらの手法を本研究で使用した手法と組み合わせることで、光化学系における電子伝達を統合的に理解できると考えられる。

表 4-3 酸素発生速度および  $^{13}\text{C}$ -MFA から概算したコントロール株および改変株の NADPH 再生速度

株名	酸素発生速度からの見積もり (mmol/gDCW/h)	$^{13}\text{C}$ -MFA からの見積もり (mmol/gDCW/h)
コントロール株	6.98 ± 0.12	6.56
改変株	4.78 ± 0.24	1.75

データは N = 4 の(平均)±(標準偏差)を示す。

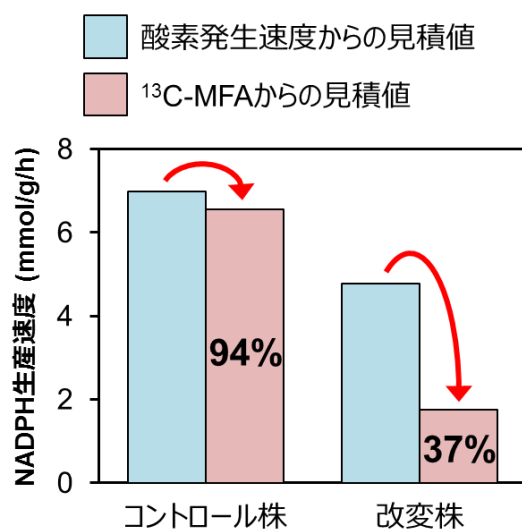


図 4-8 コントロール株および改変株における直線的電子伝達経路の稼働率

酸素発生速度および <sup>13</sup>C-MFA の結果を組み合わせることで、直線的電子伝達経路の稼働率を算出した。矢印の太さは寄与率の大きさを示している。

#### 4-4 結言

本章では、NADPH の再生/消費速度のバランスが *Synechocystis* sp. PCC 6803 の代謝システムに与える影響の解明を目的とし、NADPH 消費に関わる遺伝子の破壊によって酸化還元バランスが変化した株および野生型株について <sup>13</sup>C-MFA を行った (図 4-9、課題1)。両株の中心代謝経路上のフラックス分布を算出したところ、遺伝子破壊株において二酸化炭素の固定反応のフラックスが低下していた (図 4-5)。また、第3章で扱ったシアノバクテリア株とは異なり、二酸化炭素固定のための前駆体 RUBP の再生にカルビン回路を用いていた (図 3-4、図 4-5)。このことは、固定した二酸化炭素の散逸を抑えられるため、物質生産宿主として有用性が認められる。また、中心代謝経路上のフラックス分布から算出した補酵素の酸化還元速度のバランスは、両株とも還元速度よりも酸化速度の方が大きかった (図 4-6)。シアノバクテリアは NADPH の再生反応として、中心代謝経路以外に光化学系を有するため、酸化および還元速度の差は光化学系によって補填されたことを明らかにした。光化学系による NADPH 再生速度は、野生型株よりも遺伝子破壊株の方が小さく、光化学系の機能の低下が定量的に示唆された (図 4-6)。

<sup>13</sup>C-MFA で得られた光化学系に関する示唆を実験的に確認するため、酸素発生速度測定を採用した (図 4-9、課題2)。酸素発生速度と NADPH 再生速度は一定の関係にあることを利用し、酸素発生速度から光化学系による NADPH 再生速度を見積もった (式 4-2、図 4-7、表 4-3)。その結果、改変株において、<sup>13</sup>C-MFA から見積もった NADPH 再生速度は酸素発生速

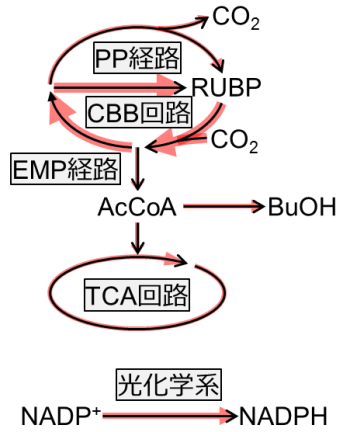
度から見積もった値に比べて小さいことが明らかになった(表 4-3)。これは、NADPH を再生する電子伝達経路である直線的電子伝達経路の稼働率が低下したことを示しており(図 4-8)、NADPH の再生を回避することで還元力過多の状態を回避したと考えられる。直線的電子伝達経路に流れなかった電子の行方について、光化学系には NADPH 再生を回避できる電子伝達経路である循環的電子伝達経路および水-水回路を有しており(図 4-1)、これらの機能を用いて還元力過多の状態を回避したのかもしれない。先行研究において、光化学系における他の電子伝達経路である循環的電子伝達経路および水-水回路の測定手法が開発された(Asada and Badger, 1984, Miyake *et al.*, 2010)。これらの手法と、本研究で使用した  $^{13}\text{C}$ -MFA および酸素発生速度測定を組み合わせることで、光化学系における電子伝達経路を統合的に理解できるようになると考えられる。補酵素の確保機構である光化学系の理解が深まることは、シアノバクテリアの増殖速度あるいは物質生産性にもつながるため、今後の研究の進捗が望まれる。また、プロテオーム解析について、本章の目的は、光化学系による電子伝達経路の稼働率の解明であり、タンパク質量の変動に関する知見は不要であったため採用しなかった。FBA について、現行のシアノバクテリアの代謝モデルでは光化学系の電子伝達経路の記述が乏しく(Montaud *et al.*, 2010)、各経路の稼働率に関する議論に適さないため採用しなかった。

本研究を通して、呼吸鎖遺伝子破壊株では、増殖速度の低下が認められた。呼吸による酸素消費は図 4-7 の赤棒で示されるように微弱であったものの、呼吸鎖とシアノバクテリアの生育は密接に関わっていることを意味している。また、クロロフィルあたりの光合成活性の向上が認められた。シアノバクテリアの場合、生産された NADPH の大部分は RUBP の再生に利用されるため、光合成活性の向上に伴う NADPH 再生速度の向上は増殖速度の向上につながると考えられる。ただし、呼吸鎖遺伝子破壊株では、直線的電子伝達経路による NADPH の再生を回避することで、還元力過多の状態を回避していた。これは、光化学系による NADPH 再生が非効率的であることを意味しており、この原因として、細胞内において NADPH を消費する反応が RUBP の再生以外にないことが考えられる。一方、MVA あるいは BuOH などの有用物質の生合成経路には NADPH を消費する反応が含まれる。つまり、呼吸鎖遺伝子破壊株に対して、有用物質生合成経路の遺伝子の導入を介した、循環的電子伝達経路および水-水回路以外の新たな NADPH 消費系を追加することは、光化学系による NADPH 再生効率の向上、および有用物質生産系に利用できるかもしれない。シアノバクテリアの呼吸鎖遺伝子破壊株に対してアルコール生合成経路を導入した先行研究において、実際に生産性が向上した例が報告されている(Hirokawa *et al.*, 2017, Yoshikawa *et al.*, 2017)。これらの知見は、第 3章で扱ったシアノバクテリアによる有用物質生産にも応用できるかもしれない。

### 課題 1

呼吸鎖遺伝子破壊株の代謝状態を明らかにする  
(<sup>13</sup>C-MFA)

- 主にCBB経路を介してRUBPを再生していた
- 二酸化炭素固定速度が低下した
- 光化学系によるNADPH生産速度が低下した



### 課題 2

呼吸鎖遺伝子破壊株における直線的電子伝達経路の稼働率を明らかにする (酸素発生速度測定)

- 酸素発生速度から見積もったNADPH再生速度は<sup>13</sup>C-MFAで求めた値よりも小さかった

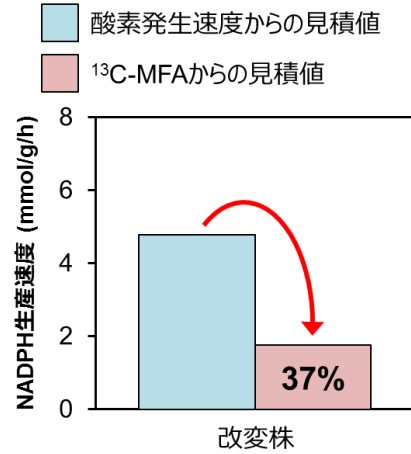


図 4-9 本章の概要

## 第5章 結論

### 5-1 各章の結果のまとめ

本学位論文では、有用物質を効率的に生産する微生物を創出するための知見を集積するため、NADPH の酸化還元バランスに着目し、有用物質を生産する従属栄養および独立栄養微生物の代謝状態、ならびにシアノバクテリアの呼吸鎖遺伝子破壊株の代謝状態を例に挙げ、それぞれについて<sup>13</sup>C-MFAを行った。NADPHは中心代謝経路上のいくつかの反応を使って再生されるため、中心代謝経路上のフラックス分布を基に酸化還元バランスを推定できる。また、NADPH は多くの微生物において共通して使われている補酵素であるため、本研究では<sup>13</sup>C-MFA を用いて微生物のフラックス分布を明らかにし、NADPH の酸化還元バランスを通して微生物の代謝を評価することにした。第2章および第3章では、有用物質を生産する微生物として大腸菌およびシアノバクテリアを宿主として選択し、補酵素 NADPH を用いた有用物質を生産する際の代謝状態から、より効率的な物質生産を行うための代謝改変戦略を見出した。第3章および第4章では、中心代謝経路以外の NADPH 再生反応である光化学系を有するシアノバクテリアを対象とし、光化学系による NADPH 再生への貢献度を明らかにした。

第2章では、従属栄養生物、かつ目的化合物の生合成に NADPH を要する物質生産例として、大腸菌による MVA 生産を挙げた。代謝状態の比較のため、MVA を生産しない株をコントロールとし、大腸菌による MVA 生産をより効率的に行うための代謝改変箇所の特定を目指した。生産株の生育特性を評価したところ、MVA 生産速度が大きかったため、NADPH の消費速度が代謝状態に与える影響が大きいことが示された。しかし、<sup>13</sup>C-MFA によるフラックス分布の推定の結果、細胞内で主要な NADPH 再生経路である PP 酸経路には差が見られなかった。フラックス分布から得られた値から NADPH の再生/消費バランスを算出したところ、生産株において、MVA を生産するための NADPH はトランスヒドロゲナーゼによって確保されることが明らかになった。また、計算機上のシミュレーションによる MVA の最大生産効率の時のフラックス分布を算出し、<sup>13</sup>C-MFA で求めた現在の代謝状態を比較した。その結果、細胞内で必要な NADPH をトランスヒドロゲナーゼのみによって生産すること、および炭素散逸のある PP 経路、酢酸生合成経路、および TCA 回路の遮断が MVA の生産効率の向上に有効であることが示された(図 5-1、第2章)。

第3章では、独立栄養生物、かつ目的化合物の生合成に NADPH を要する物質生産例として、シアノバクテリアによる BuOH 生産を挙げた。代謝状態の比較のため、BuOH を生産しない株をコントロールとし、シアノバクテリアによる BuOH 生産をより効率的に行うための代謝改変

箇所の特定を目指した。生産株の生育特性を評価したところ、非生産株に比べて増殖速度が低下していた。生産株と非生産株の違いは BuOH の生産能の有無であるため、生産した BuOH によって増殖速度が低下したと考えられる。増殖速度の低下の原因を探るため、 $^{13}\text{C}$ -MFA を用いてフラックス分布を明らかにしたところ、生産株では二酸化炭素の固定速度が低下していることを明らかにした。二酸化炭素の固定速度が低下することは細胞合成および BuOH 生産に使用するための炭素が低下することを意味するため、物質生産を行う上で好ましくない。フラックス分布から得られた値から NADPH の再生/消費バランスを算出したところ、生産株において光化学系による NADPH 再生速度が低下したことを明らかにした。光化学系を対象としたプロテオーム解析および酸素発生速度の測定の結果、生産株では光化学系のタンパク質の減少に伴う機能の低下が確認された。これらの結果を統合すると、シアノバクテリアによる BuOH の生産効率を向上させるためには、PP 経路の遮断による炭素散逸の防止、および生産した BuOH によって減少した光化学系関連のタンパク質の発現強化による光化学系の機能回復が有効であることが示された(図 5-1、第3章)。

第4章では、シアノバクテリアにおける NADPH の再生/消費バランスの変動に対する応答を明らかにするため、NADPH の再生/消費バランスに影響を与える遺伝子破壊株を対象に  $^{13}\text{C}$ -MFA を行った。両株の中心代謝経路上のフラックス分布を算出したところ、遺伝子破壊株において二酸化炭素の固定反応のフラックスが低下していた。また、中心代謝経路上のフラックス分布から算出した NADPH の再生/消費速度のバランスは、両株とも再生速度よりも消費速度の方が大きく、この差は光化学系によって補われることを明らかにした。さらに、光化学系による NADPH 再生速度は、親株よりも遺伝子破壊株の方が小さく、光化学系の機能の低下が示唆された。酸素発生速度の測定による光化学系の機能低下の検証でも同様の現象が確認されたが、遺伝子破壊株において、酸素発生速度による NADPH 再生速度の推定値と中心代謝経路による NADPH の再生/消費速度のバランスに基づく NADPH 再生速度の推定値に差異が見られた。この際は、NADPH 再生に関わる電子伝達経路である直線的電子伝達経路の稼働率が低下したことを意味する。電子伝達経路の使用度は実験による測定が困難とされていたが、 $^{13}\text{C}$ -MFA と酸素発生速度の測定を組み合わせることでシアノバクテリアの NADPH の再生/消費の収支への寄与に関する定量的な議論を可能にした(図 5-1、第4章)。

- 第2章** 従属栄養生物に関する知見を集積した
- MVA生産株の代謝状態を明らかにした
    - ・トランスヒドロゲナーゼによるNADPHの再生
  - 高生産化に向けた代謝改変戦略を立案した
    - ・PP経路、酢酸合成経路、TCA回路の遮断
    - ・TCA回路の流入フラックスの制御システムの導入
- 第3章** 独立栄養生物に関する知見を集積した
- BUOH生産株の代謝状態を明らかにした
    - ・二酸化炭素固定速度の低下
    - ・光化学系によるNADPH再生速度の低下
  - 高生産化に向けた代謝改変戦略を立案した
    - ・細胞内BuOHの排出システムの導入
    - ・PP経路の遮断
- 第4章** 光化学系に関する知見を集積した（第3章へフィードバック）
- 呼吸鎖遺伝子破壊株の代謝状態を明らかにした
    - ・二酸化炭素固定速度の低下
    - ・光化学系によるNADPH再生速度の低下
  - $^{13}\text{C}$ -MFAと酸素発生速度測定の結果を結合した
    - ・直線的電子伝達経路の稼働率の解明

図 5-1 本論文のまとめ

## 5-2 $^{13}\text{C}$ -MFA と他の解析技術の融合による代謝状態の理解

本学位論文では、微生物の代謝状態を評価するための手法として、 $^{13}\text{C}$ -MFA を採用した。 $^{13}\text{C}$ -MFA は細胞内の炭素の流れの向きおよび速さを定量的に評価でき、代謝反応に付随する NADPH の再生/消費速度を推定できる唯一の手法である (Wiechert, 2001)。この手法では、 $^{13}\text{C}$  を含む化合物を細胞に与え、細胞内代謝物中に分布した  $^{13}\text{C}$  の様態からフラックス分布を求める。 $^{13}\text{C}$ -MFA は、 $^{13}\text{C}$  添加後から一定時間経過し、細胞内に  $^{13}\text{C}$  が行き渡った時点の代謝物を対象とした解析手法 (安定同位体定常解析、第2章および第4章)、および  $^{13}\text{C}$  添加直後から数分間の以内に収束する、代謝物中の  $^{13}\text{C}$  標識割合が遷移する過程を対象とした解析手法 (安定同位体非定常解析、第3章) に大別され、本研究では微生物の性質ごとに両手法を適宜使い分けることでフラックス分布を算出し、各微生物の代謝の特徴を明らかにした。さらに、フラックス分布に基づく NADPH の再生/消費速度のバランスの評価を通して、中心代謝経路が微生物の代謝に与える影響を定量的に明らかにした。ただし、 $^{13}\text{C}$ -MFA で得られる結果は解析点における代謝状態のみであり、その代謝状態に至った細胞内の出来事あるいは経緯についての情報は含まれていないため、改変すべき代謝上の問題点の特定は  $^{13}\text{C}$ -MFA と別の手法とを併用して見出す必要がある。また、フラックス分布から算出した NADPH の再生/消費速度のバランスは中心代謝経路上の反応のみであるため、シアノバクテリアの光化学系に

よる NADPH 再生速度は推定値に過ぎず、定量的な議論を行うためには別の実験系を要する。

第2章では、 $^{13}\text{C}$ -MFA の結果および FBA の結果を比較することで、代謝改変戦略を立案した。FBA は、化学量論的に記したゲノムスケール代謝モデルを用いて、細胞内の代謝状態が定常状態であること、各代謝フラックスの上限値および下限値を制限すること、および細胞増殖を最大化すること、を基本原理として代謝フラックス分布を計算する手法である(Orth *et al.*, 2010)。 $^{13}\text{C}$ -MFA は細胞内の代謝の流れの速さを定量的に測定できるツールとして有効である。本研究では、現在の増殖速度およびグルコース取り込み速度あたりほぼ最大の MVA 生産速度を達成していたため、新たな目標値を立てる必要があった。そこで、*in silico* 代謝シミュレーションの一種である FBA を採用し、グルコース取込速度あたりの理論最大 MVA 生産速度を目標値とした。FBA では目的化合物の最大生産時のフラックス分布を算出できるため、 $^{13}\text{C}$ -MFA で算出した現状のフラックス分布との比較を通して、代謝経路上で負担がかかっている経路を特定した。

第3章では、 $^{13}\text{C}$ -MFA の結果と光化学系のプロテオーム解析を組み合わせた。プロテオーム解析は、細胞内のタンパク質群について質量分析計を用いて網羅的に定量する技術である(Marx, 2013)。本研究では BuOH 非生産株をコントロールとして設定し、生産株において発現量が変動したタンパク質を突き止めるために使用した。 $^{13}\text{C}$ -MFA では、生理条件下の代謝状態を明らかできるものの、フラックスを変化させた原因について、直接的な因果関係を示すことができない。代謝反応の直接的な駆動力として作用する物質は酵素タンパク質であるため、代謝反応群を触媒する酵素タンパク質群の一斉定量結果とフラックス分布を比較することで、フラックスが変化した原因を突き止められる。当章の場合、中心代謝経路上のフラックス分布に基づく補酵素バランスの変化から、光化学系のタンパク質の機能低下の示唆が得られたため、分析対象を光化学系に絞ってプロテオーム解析を行った。その結果、生産した BuOH によって光化学系関連のタンパク質の量が減少していることを突き止め、光化学系による還元力の生産不足が二酸化炭素固定速度および生育速度の低下の原因であることを突き止めた。

第4章では、 $^{13}\text{C}$ -MFA の結果と酸素発生速度の測定結果を組み合わせた。酸素発生速度は、培養液中の酸素濃度の経時的な観察を介してシアノバクテリアの光合成活性を測定する手法である(Saka and Chisaka, 1985)。シアノバクテリアでは、呼吸による酸素消費の他に、光化学系 II が触媒する水の還元反応の際に副次的に酸素が生産されるため、照光下において培養液中に酸素が放出される。照光下において、同時に呼吸も生じるため、これらの速度を積算した値が光合成活性を示す。最も一般的な光合成経路である直線の電子伝達系では、1 分子の酸素の発生に伴い 2 分子の NADPH を生産することから、酸素発生速度の値から光化

学系による NADPH の再生速度を推算できる。この結果を  $^{13}\text{C}$ -MFA で得られた中心代謝経路による NADPH の再生/消費速度の収支と組み合わせることで、実験による測定が困難である電子伝達経路の使用度の定量的な理解につながった。当章では、直線的電子伝達経路の稼働率の解明を目的としていたため、光化学系による NADPH 再生の記述に乏しいゲノムスケールモデル (Montaud *et al.*, 2010) を用いた FBA を採用しなかった。また、当章では光化学系による NADPH 再生ポテンシャルと  $^{13}\text{C}$ -MFA の結果を結びつけ、統合的に NADPH 再生/消費速度を評価することが目的であり、光化学系のタンパク質量に関して言及する必要がなかったため、プロテオーム解析を採用しなかった。

このように、 $^{13}\text{C}$ -MFA は他の解析技術との親和性が高く、これらの結果を組み合わせることで、 $^{13}\text{C}$ -MFA では得られない情報を補い、かつ  $^{13}\text{C}$ -MFA 特有の生理条件下における速度論的な評価をより精緻に表現できるようになった。

### 5-3 栄養条件の異なる生物種のフラックス分布に基づく有用物質生産

本学位論文では、従属栄養生物および独立栄養生物の代表として、それぞれ大腸菌およびシアノバクテリアを例に挙げ、それぞれのフラックス分布を明らかにした。各微生物が使用する特徴的な代謝経路を図 6-1 に示した。矢印の大きさはフラックスの大きさを示している。

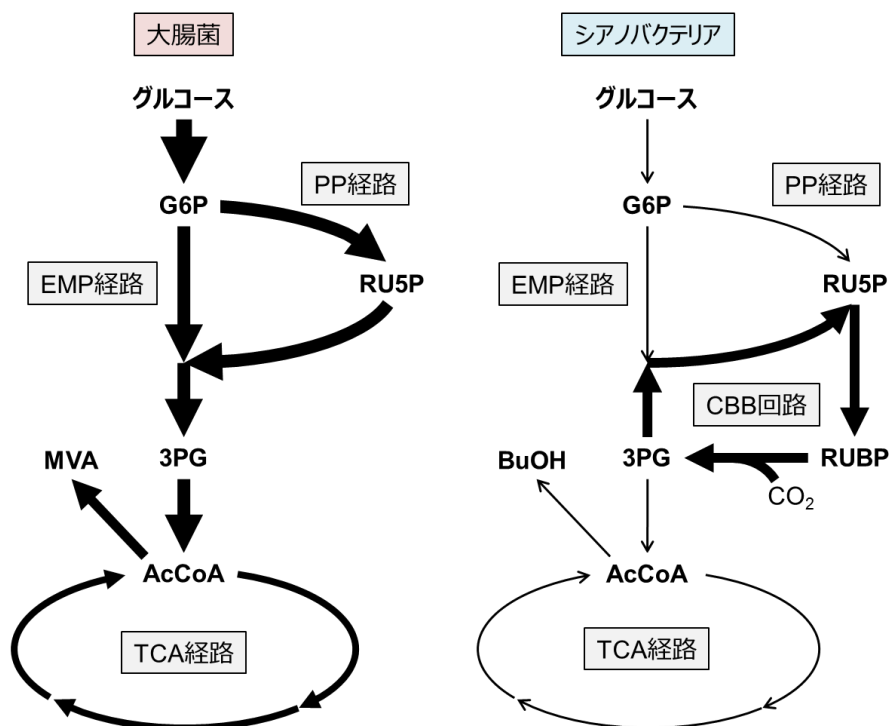


図 6-1 大腸菌およびシアノバクテリアのフラックス分布の特徴

好気条件において、大腸菌などの従属栄養生物は、取り込んだグルコースを EMP 経路および PP 経路を用いて代謝し、下流の TCA 回路へと炭素を送りこむ(図 2-10)。TCA 回路上には補酵素生産を伴う反応が多く含まれており、グルコースを二酸化炭素に分解する際に 36 分子の ATP が生産されるため、増殖期中の微生物はグルコースを TCA 回路まで送り込むことで効率的にエネルギーを獲得できる。フラックスは代謝経路全体に万遍なく流れているため、中心代謝経路上の代謝物を初発とする多くの有用物質生産に適していると言える。本研究では、MVA を生産する大腸菌を解析の対象とした。MVA は中心代謝経路上の AcCoA を生合成反応の初発としている。AcCoA は TCA 回路の初発反応の基質であるため、大腸菌による MVA 生産の場合、グルコース異化による豊富な炭素フローを TCA 回路と競合して引き抜くだけで高い効率での物質生産を達成しうる。また、大腸菌のフラックス分布は EMP 経路、PP 経路、および TCA 回路ともにフラックス量が大きいいため、中心代謝経路上の代謝物を前駆体とする有用物質生産において炭素の供給量不足に陥る可能性は低い。特に、大腸菌を好気的な条件で培養した場合、取り込んだグルコースのうち、TCA 回路で処理できない炭素は AcCoA から生合成される酢酸として細胞外に排出される(Mey *et al.*, 2007)。これは行き場を失った炭素がオーバーフローしていることを示しており、この現象を利用して、AcCoA を初発代謝物とする MVA、BuOH、脂肪酸、およびイソプロパノールなどの目的化合物の生産に充てることができれば、好気条件における高生産が期待できる。

一方、シアノバクテリアなどの独立栄養生物の場合、CBB 回路を用いた二酸化炭素の固定が炭素源になる。CBB 回路では 5 炭素からなる RUBP を再生しなければ新たに二酸化炭素を固定できないため、必然的に CBB 回路にフラックスが集中する。CBB 回路一周につき、取り込んだ二酸化炭素の分炭素原子が得られるため、CBB 回路を三周することで、RUBP の再生に用いない 3PG が 1 分子分生産される。この余剰の 3PG をシアノバクテリアは細胞合成および目的化合物の生産に充てる。また、第3章および第4章の解析結果によると、TCA 回路へのフラックスはシアノバクテリア属によって若干異なっていたものの、ほとんど細胞合成に必要な最小限の量に留まっていた(図 3-4、図 4-5)。これは、シアノバクテリアは大腸菌と異なり、光化学系を用いて NADPH および ATP を生産できるため、TCA 回路を用いた還元力の生産が必ずしも必要ではないためであると考えられる。さらに、第4章で扱ったシアノバクテリア株はグルコースを炭素源として代謝できるものの、先行研究および本研究を通してみても取込速度は微小であり(表 4-1、You *et al.*, 2014、Nakajima *et al.*, 2014)、グルコース添加による TCA 回路へのフラックスの向上は見られなかった(Young *et al.*, 2011)。しかし、二酸化炭素のみを炭素源とした培養条件下における増殖速度と比べると、グルコースの添加によって増殖速度はわずかに向上しており、余剰の 3PG の生産に寄与していると考えられる。シアノバクテリアのグル

コースの取込速度を強化できれば、余剰の 3PG を用いた物質生産系が構築できるかもしれない。本研究では、BuOH を生産するシアノバクテリアを解析の対象とした。AcCoA までのフラックスがそもそも貧弱であり、TCA 回路へのフラックスも細胞合成に必要最小限に抑えられているため、高い効率での BuOH 生産が望めない。シアノバクテリアにおいて、3PG よりも下流に位置する代謝物を初発反応とした物質生産を行う場合、代謝改変の初手として、3PG から炭素フローを引き抜くことが重要であると言える。一方、フラックスが大きい CBB 回路周辺の代謝物を反応の初発とした物質生産系の構築は炭素供給の面で利便性が高い。大腸菌における AcCoA と同様に、もともとフラックスが豊富な経路から目的化合物の生合成のためのフラックスを引き抜くことは比較的容易である。例えば、F6P から生合成される D-マンニトール、DHAP から生合成されるジヒドロキシアセトンおよび 3-ヒドロキシプロピオン酸、ならびに E4P から生合成される *p*-クマル酸などの生産はシアノバクテリアにおいて高生産が期待できる。

#### 5-4 栄養条件の異なる生物種の NADPH 生産/消費速度からみた有用物質生産

本学位論文では、従属栄養生物および独立栄養生物の代表として、それぞれ大腸菌およびシアノバクテリアを例に挙げ、<sup>13</sup>C-MFA および酸素発生速度測定を基に NADPH の再生/消費速度への寄与を明らかにした。中心代謝経路上には NADPH を再生するいくつかの反応があり、細胞合成による NADPH の消費速度を推察できることから、<sup>13</sup>C-MFA によって中心代謝経路上のフラックスが明らかになれば、細胞内の NADPH の再生/消費速度を見積れる。<sup>13</sup>C-MFA を通して明らかにした各微生物が使用する特徴的な NADPH の再生反応を示した(表 5-1)。

表 5-1 各栄養条件を代表する微生物が使用する NADPH 再生反応

NADPH 再生の特徴	大腸菌	シアノバクテリア
主な NADPH 再生反応 (脱炭酸を伴う)	PP 経路、TCA 回路	PP 経路、光化学系
脱炭酸を伴わない NADPH 再生反応	トランスヒドロゲナーゼ	光化学系

従属栄養生物である大腸菌では、主に PP 経路および TCA 回路を用いて NADPH を再生していた(図 2-8、表 5-1)。ただし、中心代謝経路上の反応を用いて NADPH を再生することは脱炭酸を伴うため、これらの経路を使った NADPH の再生は、有用物質生産に充てるための炭素の減少につながり、効率的な物質生産が期待できない。これに対し、第2章で扱った

MVA を生産する大腸菌は、補酵素間による電子の授受によって NADPH を再生できるトランスヒドロゲナーゼを利用して、この酵素による NADPH 再生は、炭素の散逸を防げるため、効率的な物質生産が期待できる。実際に、トランスヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を導入した株において、物質生産性が向上した例が報告されている (Tanaka *et al.*, 2017、Yamauchi *et al.*, 2014、Kabus *et al.*, 2007)。しかし、細胞内に過剰な NADPH が存在することは細胞の増殖に対して悪影響を与えることも報告されており (Sauer *et al.*, 2004)、トランスヒドロゲナーゼがカバーできる NADPH の再生/消費バランスの範囲に関する知見を深める必要があると言える。

一方、独立栄養生物であるシアノバクテリアのうち、第3章で扱った BuOH 生産株では、主に PP 経路および光化学系を用いて NADPH を再生していた (図 3-4、図 3-5、表 5-1)。PP 経路を利用して NADPH を再生する特徴は、先行研究における二酸化炭素を単一炭素源としたシアノバクテリアの  $^{13}\text{C}$ -MFA の結果とは一致せず (Young *et al.*, 2011、Nakajima *et al.*, 2017)、解析対象株の代謝の特徴と言える。しかし、PP 経路は炭素を排出する反応をもつため、二酸化炭素の固定によって炭素源を確保するシアノバクテリアにとって、炭素および NADPH の収支の観点から無益な代謝経路と言える。また、この株はシアノバクテリアにおいて最大の BuOH の生産能力をもつものの、BuOH 生合成に使われる NADPH は微弱であり (図 3-4、図 3-5)、BuOH を生合成すること自体はシアノバクテリアの代謝に影響を与えないと考えられる。

第4章で扱ったシアノバクテリア株では、主に光化学系を用いて NADPH を再生していた (図 4-6、表 5-1)。この株では、PP 経路による NADPH 再生への寄与率は小さく (図 4-6)、先行研究の値と整合性がとれた (You *et al.*, 2014、Nakajima *et al.*, 2014)。ただし、遺伝子破壊株の光化学系による NADPH 再生速度は親株と比べて半分以下に低下しており、呼吸鎖が NADPH 消費に寄与する割合が高いことが示された。一方、酸素発生速度から見積もられた NADPH 再生速度について、遺伝子破壊株では  $^{13}\text{C}$ -MFA から見積もられた値に対して倍以上高く、中心代謝経路上の NADPH 消費反応のフラックスが小さかったことから (図 4-5、図 4-6)、光化学系による NADPH 再生に関わる電子伝達経路である、直線的電子伝達経路の稼働率の低下が示された (表 4-3、図 4-8)。直線的電子伝達経路に利用されなかった電子は、循環的電子伝達系および水-水回路に流れる可能性がある。これらの機構は、細胞が光環境ストレスに曝された際の還元力消費の緊急対策として用いられることが知られている (Yamori *et al.*, 2016)。しかし、物質生産中の微生物は、培養環境が一定に保たれることが多く、このような機構は必ずしも必要ではない。仮に、この機構を完全に停止させ、余剰の NADPH が CBB 回路に使えた場合、現状の株の約 3.5 倍の二酸化炭素固定速度が見込める (改変株; 0.95 mmol/gDCW/h、還元力消費抑制株; 3.34 mmol/gDCW/h)。また、先行研究では、呼吸鎖遺伝子の破壊によって生じた余剰の NADPH を物質生産に充当させることで、NADPH の

再生/消費システムのカップリングによりアルコール類の生産性が向上した例が報告されている (Hirokawa *et al.*, 2017、Yoshikawa *et al.*, 2017)。これらの知見は、第3章の BuOH 生産株などにも応用できるかもしれない。

本研究を通して、各栄養条件を代表する有用物質生産宿主の特徴的なフラックス分布を明らかにし、それぞれの微生物の代謝状態に適した有用物質の例を挙げた。有用物質生産は宿主微生物のフラックス分布および NADPH 収支と密接に関係しているため、目的化合物の前駆体とフラックスの分布に基づいて物質生産系を構築する必要があると言える。本研究では、実際に作製した有用物質生産株について、細胞合成および目的化合物の生合成の際に用いられる NADPH に注目し、<sup>13</sup>C-MFA と他の解析技術を組み合わせて代謝状態を評価することで、微生物の抱える代謝上の問題点を特定することに貢献した。

## 参考文献

- Abdelaal, A. S., Ageez, A. M., Abd El-Hadi, A. E., and Abdallah, N. A.:** Genetic improvement of *n*-butanol tolerance in *Escherichia coli* by heterologous overexpression of *groESL* operon from *Clostridium acetobutylicum*, *3 Biotech.* **5**(4), 401–10, (2015)
- Angermayr, S. A., Gorchs Rovira, A., and Hellingwerf, K. J.:** Metabolic engineering of cyanobacteria for the synthesis of commodity products, *Trends Biotechnol.* **33**(6), 352–61, (2015)
- Antoniewicz, M. R., Kelleher, J. K., and Stephanopoulos, G.:** Determination of confidence intervals of metabolic fluxes estimated from stable isotope measurements, *Metab. Eng.* **8**(4), 324–37, (2006)
- Antoniewicz, M. R., Kelleher, J. K., and Stephanopoulos, G.:** Accurate assessment of amino acid mass isotopomer distributions for metabolic flux analysis, *Anal. Chem.* **79**(19), 7554–59, (2007a)
- Antoniewicz, M. R., Kelleher, J. K., and Stephanopoulos, G.:** Elementary metabolite units (EMU): a novel framework for modeling isotopic distributions, *Metab. Eng.* **9**(1), 68–86, (2007b)
- Antoniewicz, M. R., Kraynie, D. F., Laffend, L. A., González-Lergier, J., Kelleher, J. K., and Stephanopoulos, G.:** 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**, 277–92, (2007c)
- Asada, K., and Badger, M. R.:** Photoreduction of  $^{18}\text{O}_2$  and  $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$  with concomitant evolution of  $^{16}\text{O}_2$  in intact spinach chloroplasts: evidence for scavenging of hydrogen peroxide by peroxidase, *Plant Cell Physiol.* **25**(7), 1169–79, (1984)

- Atsumi, S., Higashide, W., and Liao, J. C.:** Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde, *Nat. Biotechnol.* **27**(12), 1177–80, (2009)
- Atsumi, S., Wu, T. Y., Eckl, E. M., Hawkins, S. D., Buelter, T., and Liao, J. C.:** Engineering the isobutanol biosynthetic pathway in *Escherichia coli* by comparison of three aldehyde reductase/alcohol dehydrogenase genes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**(3), 651–7, (2010)
- Backhausen, J. E., Kitzmann, C., Horton, P., and Scheibe, R.:** Electron acceptors in isolated intact spinach chloroplasts act hierarchally to prevent overreduction and competition for electrons, *Photosynth. Res.* **64**, 1–13, (2000)
- Becker, S. A., Feist, A. M., Mo, M. L., Hannum, G., Palsson, B. Ø., and Herrgard, M. J.:** Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox, *Nat. Protoc.* **2**(3), 727–38, (2007)
- Berezina, O. V., Zakharova, N. V., Brandt, A., Yarotsky, S. V., Schwarz, W. H., and Zverlov, V. V.:** Reconstructing the clostridial n-butanol metabolic pathway in *Lactobacillus brevis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**(2), 635–46, (2010)
- Bologna, F. P., Andreo, C. S., and Drincovich, M. F.:** *Escherichia coli* malic enzymes: two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure, *J. Bacteriol.* **189**(16), 5937–46, (2007)
- Bowles, L. K., and Ellefson, W. L.:** Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*, *Appl. Environ. Microbiol.* **50**(5), 1165–70, (1985)
- Chen, G.:** Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas, *Mol. Cell. Proteomics* **1**(4), 304–13, (2002)
- Chen, X., Alonso, A. P., Allen, D. K., Reed, J. L., and Shachar-Hill, Y.:** Synergy between <sup>13</sup>C-metabolic flux analysis and flux balance analysis for understanding metabolic adaptation to anaerobiosis in *E. coli*, *Metab. Eng.* **13**(1), 38–48, (2011)

- De Mey, M., De Maeseneire, S., Soetaert, W., and Vandamme, E.:** Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**(11), 689–700, (2007)
- Dismukes, G. C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G. M., and Posewitz, M. C.:** Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels, *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**(3), 235–40, (2008)
- Ducat, D. C., Avelar-Rivas, J. A., Way, J. C., and Silver, P. A.:** Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity, *Appl. Environ. Microbiol.* **78**(8), 2660–8, (2012)
- Feist, A. M., Henry, C. S., Reed, J. L., Krummenacker, M., Joyce, A. R., Karp, P. D., Broadbelt, L. J., Hatzimanikatis, V., and Palsson, B. Ø.:** A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information, *Mol. Syst. Biol.* **3**(121), (2007)
- Haratake. A., Ikenaga. K., Katoh. N., Uchiwa. H., Hirano. S., and Yasuno. H.:** Topical mevalonic acid stimulates de novo cholesterol synthesis and epidermal permeability barrier homeostasis in aged mice, *J. Invest. Dermatol.* **114**(2), 247–52, (2000)
- He, L., Xiao, Y., Gebreselassie, N., Zhang, F., Antoniewicz, M.R., Tang, Y.J., and Peng, L.:** Central metabolic responses to the overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* based on <sup>13</sup>C-metabolic flux analysis, *Biotechnol. Bioeng.* **111**(3), 575–85, (2014)
- Heber, U.:** Irrungen, Wirungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants, *Photosynth. Res.* **73**, 223–231, (2002)
- Hedl, M., Sutherlin, A., Wilding, E. I., Mazzulla, M., McDevitt, D., Lane, P., Burgner, J. W. 2nd, Lehnbeuter, K. R., Stauffacher, C. V., Gwynn, M. N., and Rodwell, V. W.:** *Enterococcus faecalis* acetoacetyl-coenzyme A thiolase/3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, a dual-function protein of isopentenyl diphosphate biosynthesis, *J. Bacteriol.* **184**(8), 2116–22, (2002)

- Hirokawa, Y., Matsuo, S., Hamada, H., Matsuda, F., and Hanai, T.:** Metabolic engineering of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for improvement of 1,3-propanediol and glycerol production based on in silico simulation of metabolic flux distribution, *Microb. Cell Fact.* **16**(1), 212, (2017)
- Ho, N. W. Y., Chen, Z., and Brainard, A. P.:** Recombinant yeasts for effective fermentation of glucose and xylose, US Patent 5,789,210 (1998)
- Ikeuchi, M., and Tabata, S.:** *Synechocystis* sp. PCC 6803 - a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria, *Photosynth. Res.* **70**(1), 73–83, (2001)
- Ingraham, J. L., Maaløe, O., and Neidhardt, F. C.:** Growth of the bacterial cell, pp. 128, Sinauer Associates Inc.: Sunderland, MA, USA, (1983)
- Jang, Y. S., Kim, B., Shin, J. H., Choi, Y. J., Choi, S., Song, C. W., Lee, J., Park, H. G., and Lee, S. Y.:** Bio-based production of C2-C6 platform chemicals, *Biotechnol. Bioeng.* **109**(10), 2437–59, (2012)
- Jazmin, L. J., and Young, J. D.:** Isotopically nonstationary <sup>13</sup>C metabolic flux analysis, *Methods Mol. Biol.* **985**, 367–90, (2013)
- Kabus, A., Georgi, T., Wendisch, V. F., and Bott, M.:** Expression of the *Escherichia coli* *pntAB* genes encoding a membrane-bound transhydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* improves L-lysine formation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**(1), 47–53, (2007)
- Kajihata, S., Furusawa, C., Matsuda, F., and Shimizu, H.:** OpenMebius: an open source software for isotopically nonstationary <sup>13</sup>C-based metabolic flux analysis, *Biomed. Res. Int.* 2014, 627014 (2014)
- 片平悟史、徳弘健郎:キシロースイソメラーゼ及びその利用、特開 2011-147445 (2011)

- King, Z. A., Lu, J., Dräger, A., Miller, P., Federowicz, S., Lerman, J. A., Ebrahim, A., Palsson, B. Ø., and Lewis, N. E.:** BiGG Models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models, *Nucleic. Acids. Res.* **44**, D515–D522, (2015)
- Kusakabe, T., Tatsuke, T., Tsuruno, K., Hirokawa, Y., Atsumi, S., Liao, J. C., and Hanai, T.:** Engineering a synthetic pathway in cyanobacteria for isopropanol production directly from carbon dioxide and light, *Metab. Eng.* **20**, 101–8, (2013)
- Kuyper, M., Harhangi, H. R., Stave, A. K., Winkler, A. A., Jetten, M. S., de Laat, W. T., den Ridder, J. J., Op den Camp, H. J., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T.:** High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?, *FEMS Yeast Res.* **4**(1), 69–78, (2003)
- Kuzuyama, T.:** Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**(8), 1619–27, (2002)
- Kuzuyama, T., Dairi, T., Yamashita, H., Shoji, Y., and Seto, H.:** Heterologous mevalonate production in *Streptomyces lividans* TK23, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**(4), 931–4, (2004)
- Kuzuyama, T., Hemmi, H., and Takahashi, S.:** Mevalonate pathway in bacteria and archaea, pp. 493-516, in: Mander, L. and Liu, H-W. (Ed.), *Comprehensive natural products II*, vol. 1. Elsevier, Oxford, (2010)
- Lan, E. I., Ro, S. Y., and Liao, J. C.:** Oxygen-tolerant coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase facilitates efficient photosynthetic *n*-butanol biosynthesis in cyanobacteria, *Energy Environ. Sci.* **6**, 2672–81, (2013)

- Lindberg, P., Park, S., and Melis, A.:** Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism, *Metab. Eng.* **12**(1), 70–9, (2010)
- Martin, V. J., Pitera, D. J., Withers, S. T., Newman, J. D., and Keasling J. D.:** Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids, *Nat. Biotechnol.* **21**(7), 796–802, (2003)
- Marx, V.:** Targeted proteomics, *Nat. Methods* **10**(1), 19–22, (2013)
- Matsubara, M., Urano, N., Yamada, S., Narutaki, A., Fujii, M., and Kataoka, M.:** Fermentative production of 1-propanol from D-glucose, L-rhamnose and glycerol using recombinant *Escherichia coli*, *J. Biosci. Bioeng.* **122**(4), 421–6 (2016)
- Matsusako, T., Toya, Y., Yoshikawa, K., and Shimizu, H.:** Identification of alcohol stress tolerance genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 by using adaptive laboratory evolution, *Biotechnol. Biofuels*, in press
- Miyake, C.:** Alternative electron flows (water-water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: molecular mechanisms and physiological functions, *Plant Cell Physiol.* **51**(12), 1951–63, (2010)
- Miziorko, H. M.:** Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis, *Arch. Biochem. Biophys.* **505**(2), 131–43, (2011)
- Montagud, A., Navarro, E., Fernández de Córdoba, P., Urchueguía, J. F., and Patil, K. R.:** Reconstruction and analysis of genome-scale metabolic model of a photosynthetic bacterium, *BMC Syst Biol.* **4**, 156, (2010)
- Nakajima, T., Kajihata, S., Yoshikawa, K., Matsuda, F., Furusawa, C., Hirasawa, T., and Shimizu, H.:** Integrated metabolic flux and omics analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803

- under mixotrophic and photoheterotrophic conditions, *Plant Cell Physiol.* **55**(9), 1605–12, (2014)
- Nakajima, T., Yoshikawa, K., Toya, Y., Matsuda, F., and Shimizu, H.:** Metabolic flux analysis of the *Synechocystis* sp. PCC 6803  $\Delta nrtABCD$  mutant reveals a mechanism for metabolic adaptation to nitrogen-limited conditions, *Plant Cell Physiol.* **58**(3), 537–45, (2017)
- Nielsen, D. R., Yoon, S. H., Yuan, C. J., and Prather, K. L.:** Metabolic engineering of acetoin and meso-2, 3-butanediol biosynthesis in *E. coli*, *Biotechnol. J.* **5**(3), 274–84, (2010)
- Nishino, S., Okahashi, N., Matsuda, F., and Shimizu, H.:** Absolute quantitation of glycolytic intermediates reveals thermodynamic shifts in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking *PFK1* or *ZWF1* genes, *J. Biosci. Bioeng.* **120**(3), 280–6, (2015)
- Ogawa, T., and Mi, H.:** Cyanobacterial NADPH dehydrogenase complexes, *Photosynth. Res.* **93**(1-3), 69–77, (2007)
- Ogawa, T., Harada, T., Ozaki, H., and Sonoike, K.:** Disruption of the *ndhF1* gene affects Chl fluorescence through state transition in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, resulting in apparent high efficiency of photosynthesis, *Plant Cell Physiol.* **54**(7), 1164–71, (2013)
- Okahashi, N., Kajihata, S., Furusawa, C., and Shimizu, H.:** Reliable metabolic flux estimation in *Escherichia coli* central carbon metabolism using intracellular free amino acids, *Metabolites*, **4**(2), 408–20, (2014)
- Oliver, J. W., and Atsumi, S.:** Metabolic design for cyanobacterial chemical synthesis, *Photosynth. Res.* **120**(3), 249-61, (2014)
- Orth, J. D., Thiele, I., and Palsson, B. Ø.:** What is flux balance analysis?, *Nat. Biotechnol.* **28**(3), 245–8, (2010)

- Ostergaard, S., Olsson, L., and Nielsen, J.:** Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**(1), 34–50, (2000)
- Park, S. J., Lee, S. Y., Cho, J., Kim, T. Y., Lee, J. W., Park, J. H., and Han, M. J.:** Global physiological understanding and metabolic engineering of microorganisms based on omics studies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**(5), 567–79, (2005)
- Quek, L. E., Wittmann, C., Nielsen, L. K., and Kromer, J. O.:** OpenFLUX: efficient modelling software for <sup>13</sup>C-based metabolic flux analysis, *Microb. Cell Fact.* **8**(25), (2009)
- Roca, C., Nielsen, J., and Olsson, L.:** Metabolic engineering of ammonium assimilation in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(8), 4732–6, (2003)
- Romero, S., Merino, E., Bolívar, F., Gosset, G., and Martinez, A.:** Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism, *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(16), 5190–8, (2007)
- Saka, H., and Chisaka, H.:** Photosynthesis measurement by oxygen electrode as a simple bioassay method, *Jan. Agric. Res. Q.* **18**, 252–9, (1985)
- Sanchez, A. M., Andrews, J., Hussein, I., Bennett, G. N., and San, K. Y.:** Effect of overexpression of a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (UdhA) on the production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Prog.* **22**(2), 420–5, (2006)
- Sauer, U., Canonaco, F., Heri, S., Perrenoud, A., and Fischer, E.:** The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* **279**(8), 6613–9, (2004)

- Schadeweg, V., and Boles, E.:** *n*-Butanol production in *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the availability of coenzyme A and cytosolic acetyl-CoA, *Biotechnol. Biofuels* **9**(44), (2016)
- Schulze K. L., and Lipe, R. S.:** Relationship between substrate concentration, growth rate, and respiration rate of *Escherichia coli* in continuous culture, *Arch. Mikrobiol.* **48**, 1–20, (1964)
- Shen, C. R., Lan, E. I., Dekishima, Y., Baez, A., Cho, K. M., and Liao, J. C.:** Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* **77**(9), 2905–15, (2011)
- Soma, Y., Tsuruno, K., Wada, M., Yokota, A., and Hanai, T.:** Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch, *Metab. Eng.* **23**, 175–84, (2014)
- Stephanopoulos, G.:** Metabolic fluxes and metabolic engineering, *Metab. Eng.* **1**(1), 1–11, (1999)
- Tabata, K., and Hashimoto, S.:** Production of mevalonate by a metabolically-engineered *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.* **26**(19), 1487–91, (2004)
- Tamura, G., Ando, K., Kodama, K., and Arima, K.:** Production of mevalonic acid by fermentation, *Appl. Microbiol.* **16**(7), 965–72, (1968)
- Tanaka, K., Natsume, A., Ishikawa, S., Takenaka, S., and Yoshida, K.:** A new-generation of *Bacillus subtilis* cell factory for further elevated scyllo-inositol production, *Microb. Cell Fact.* **16**(67), (2017)
- Tang, Y. J., Sapra, R., Joyner, D., Hazen, T. C., Myers, S., Reichmuth, D., Blanch, H., and Keasling, J. D.:** Analysis of metabolic pathways and fluxes in a newly discovered thermophilic and ethanol-tolerant *Geobacillus* strain, *Biotechnol Bioeng.* **102**(5), 1377–86, (2009)

- Tokuyama, K., Ohno, S., Yoshikawa, K., Hirasawa, T., Tanaka, S., Furusawa, C., and Shimizu, H.:** Increased 3-hydroxypropionic acid production from glycerol, by modification of central metabolism in *Escherichia coli*, *Microb. Cell Fact.* **13**(64), (2014)
- Träff, K. L., Otero Cordero, R. R., van Zyl, W. H., and Hahn-Hägerdal, B.:** Deletion of the *GRE3* aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *xylA* and *XKS1* genes, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(12), 5668–74, (2001)
- 植林希代加: シアノバクテリアの光合成におけるターゲットプロテオーム分析、卒業論文、(2016)
- Vallino, J. J., and Stephanopoulos, G.:** Carbon flux distributions at the glucose 6-phosphate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction, *Biotechnol. Prog.* **10**, 327–34, (1994)
- Van Hoek, P., Van Dijken, J. P., and Pronk, J. T.:** Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(11), 4226–33, (1998)
- van Winden, W. A., Wittmann, C., Heinzle, E., and Heijnen, J. J.:** Correcting mass isotopomer distributions for naturally occurring isotopes, *Biotechnol. Bioeng.* **80**(4), 477–9, (2002)
- van Winden, W. A., van Dam, J. C., Ras, C., Kleijn, R. J., Vinke, J. L., van Gulik, W. M., and Heijnen, J. J.:** Metabolic-flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D based on mass isotopomer measurements of <sup>13</sup>C-labeled primary metabolites, *FEMS Yeast Res.* **5**(6–7), 559–68, (2005)
- Verho, R., Londesborough, J., Penttilä, M., and Richard, P.:** Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(10), 5892–7, (2003)

- Vollherbst-Schneck, K., Sands, J. A., and Montenecourt, B. S.:** Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Appl. Environ. Microbiol.* **47**(1), 193-4, (1984)
- Vucic, E. A., Thu, K. L., Robison, K., Rybaczyk, L. A., Chari, R., Alvarez, C. E., and Lam, W. L.:** Translating cancer ‘omics’ to improved outcomes paradigm Translating cancer “omics” to improved outcomes, *Genome Reas.* **22**(2), 188–95, (2012)
- Wang, B., Wang, J., Zhang, W., and Meldrum, D. R.:** Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae, *Front Microbiol.* **3**, 344, (2012)
- Wang, C., Yoon, S. H., Shah, A. A., Chung, Y. R., Kim, J. Y., Choi, E. S., Keasling, J. D., and Kim, S. W.:** Farnesol production from *Escherichia coli* by harnessing the exogenous mevalonate pathway, *Biotechnol. Bioeng.* **107**(3), 421–9, (2010)
- Wiechert, W.:** <sup>13</sup>C metabolic flux analysis, *Metab. Eng.* **3**, 195–206, (2001)
- Willkins, M. R., and Atiye, H.:** Fermentation, pp. 195, in: Dunford, N. D. (Ed.), Food and Industrial Bioproducts and Bioprocessing, Wiley, (2012)
- Wittmann, C.:** Fluxome analysis using GC–MS, *Microb. Cell. Fact.* **6**(6), (2007)
- Wendisch, V. F., Bott, M., and Eikmanns, B. J.:** Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids, *Curr. Opin. Microbiol.* **9**(3), 268–74, (2006)
- Yamauchi, Y., Hirasawa, T., Nishii, M., Furusawa, C., and Shimizu, H.:** Enhanced acetic acid and succinic acid production under microaerobic conditions by *Corynebacterium glutamicum* harboring *Escherichia coli* transhydrogenase gene *pntAB*, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **60**(3), 112–8, (2014)

- Yamori, W., Shikanai, T., and Makino, A.:** Photosystem I cyclic electron flow via chloroplast NADH dehydrogenase-like complex performs a physiological role for photosynthesis at low light, *Sci. Rep.* **5**, 13908, (2015)
- Yan, Y., and Liao, J. C.:** Engineering metabolic systems for production of advanced fuels, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**(4), 471–9, (2009)
- Yoon, S. H., Lee, S. H., Das, A., Ryu, H. K., Jang, H. J., Kim, J. Y., Oh, D. K., Keasling, J. D., and Kim, S. W.:** Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of beta-carotene in *E. coli*, *J. Biotechnol.*, **140**, 218–26, (2009)
- Yoshikawa, K., Toya, Y., and Shimizu, H.:** Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for enhanced ethanol production based on flux balance analysis, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **40**(5), 791–796, (2017)
- You, L., Berla, B., He, L., Pakrasi, H. B., and Tang, Y. J.:** <sup>13</sup>C-MFA delineates the photomixotrophic metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under light- and carbon-sufficient conditions, *Biotechnol. J.* **9**(5), 684–92, (2014)
- Young, J. D., Shastri, A. A., Stephanopoulos, G., and Morgan, J. A.:** Mapping photoautotrophic metabolism with isotopically nonstationary <sup>13</sup>C flux analysis, *Metab. Eng.* **13**(6), 656–65, (2011)
- Youngquist, J. T., Lennen, R. M., Ranatunga, D. R., Bothfeld, W. H., Marnier, W. D. 2nd, and Pfleger, B. F.:** Kinetic modeling of free fatty acid production in *Escherichia coli* based on continuous cultivation of a plasmid free strain, *Biotechnol. Bioeng.* **109**(6), 1518–27, (2012)
- Zheng, Y., Liu, Q., Li, L., Qin, W., Yang, J., Zhang, H., Jiang, X., Cheng, T., Liu, W., Xu, X., and Xian, M.:** Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-specificity production of isoprenol and prenilol as next generation of biofuels, *Biotechnol. Biofuels* **6**(57), (2013)



## 付録

付録表 2-1 大腸菌の代謝モデル

代謝反応	炭素骨格移動
Glucose --> G6P	ABCDEF --> ABCDEF
PEP --> PYR	ABC --> ABC
G6P <--> F6P	ABCDEF --> ABCDEF
F6P --> FBP	ABCDEF --> ABCDEF
FBP <--> DHAP + GAP	ABCDEF --> CBA + DEF
DHAP <--> GAP	ABC --> ABC
GAP <--> 3PG	ABC --> ABC
3PG <--> PEP	ABC --> ABC
PEP --> PYR	ABC --> ABC
PYR --> AcCoA + CO2_in	ABC --> BC + A
AcCoA + OXA --> IsoCIT	AB + CDEF --> FEDBAC
IsoCIT --> AKG + CO2in	ABCDEF --> ABCDE + F
AKG --> SUC + CO2in	ABCDE --> BCDE + A
SUC <--> FUM	ABCD <--> ABCD
FUM <--> MAL	ABCD <--> ABCD
MAL <--> OXA	ABCD --> ABCD
IsoCIT + AcCoA --> MAL + SUC	ABCDEF + GH --> ABHG + FCDE
PEP + CO2_in --> OXA	ABC + D --> ABCD
OXA --> PEP + CO2_in	ABCD --> ABC + D
G6P --> 6PG	ABCDEF --> ABCDEF
6PG --> RU5P + CO2in	ABCDEF --> BCDEF + A
RU5P <--> R5P	ABCDE <--> ABCDE
RU5P <--> X5P	ABCDE <--> ABCDE
R5P + X5P <--> S7P + GAP	ABCDE + FGHIJ <--> FGABCDE + HIJ
GAP + S7P <--> F6P + E4P	ABC + DEFGHIJ <--> DEFABC + GHIJ
E4P + X5P <--> F6P + GAP	ABCD + EFGHI <--> EFABCD + GHI
6PG --> PYR + GAP	ABCDEF --> ABC + DEF
AcCoA --> MVA	nd

付録表 2-2 大腸菌の実測および推定 MID

コントロール株				改変株			
フラグメント	質量	実測値	予測値	フラグメント	質量	実測値	予測値
Ala_57	m+0	0.573	0.580	Ala_57	m+0	0.590	0.592
	m+1	0.412	0.403		m+1	0.396	0.392
	m+2	0.014	0.016		m+2	0.013	0.015
	m+3	0.002	0.001		m+3	0.001	0.000
Ala_85	m+0	0.580	0.591	Ala_85	m+0	0.606	0.608
	m+1	0.412	0.400		m+1	0.386	0.384
	m+2	0.008	0.008		m+2	0.007	0.008
Asp_57	m+0	0.442	0.437	Asp_57	m+0	0.482	0.484
	m+1	0.434	0.435		m+1	0.420	0.425
	m+2	0.115	0.114		m+2	0.086	0.085
	m+3	0.009	0.011		m+3	0.012	0.004
	m+4	0.000	0.000		m+4	0.709	0.708
Asp_85	m+0	0.492	0.488	Asp_85	m+0	0.268	0.269
	m+1	0.430	0.427		m+1	0.023	0.022
	m+2	0.075	0.078		m+2	0.434	0.432
	m+3	0.003	0.005		m+3	0.436	0.436
Asp159	m+0	0.483	0.488	Asp159	m+0	0.121	0.120
	m+1	0.424	0.427		m+1	0.009	0.010
	m+2	0.081	0.078		m+2	0.000	0.000
	m+3	0.012	0.005		m+3	0.490	0.484
Asp_302	m+0	0.723	0.725	Asp_302	m+0	0.426	0.425
	m+1	0.255	0.259		m+1	0.081	0.085
	m+2	0.022	0.015		m+2	0.004	0.004
Glu_57	m+0	0.301	0.288	Glu_57	m+0	0.335	0.336
	m+1	0.442	0.448		m+1	0.459	0.457
	m+2	0.215	0.221		m+2	0.186	0.185
	m+3	0.041	0.038		m+3	0.019	0.019
	m+4	0.003	0.003		m+4	0.001	0.000
	m+5	0.000	0.000		m+5	0.295	0.294
Glu_159	m+0	0.321	0.319	Glu_159	m+0	0.443	0.444
	m+1	0.456	0.461		m+1	0.218	0.218
	m+2	0.203	0.196		m+2	0.041	0.038
	m+3	0.020	0.020		m+3	0.003	0.002

	m+4	0.001	0.000		m+4	0.000	0.000
Gly_57	m+0	0.954	0.952	Gly_57	m+0	0.934	0.950
	m+1	0.045	0.046		m+1	0.061	0.046
	m+2	0.001	0.002		m+2	0.005	0.002
	m+0	0.964	0.970		m+0	0.958	0.967
	m+1	0.036	0.029		m+1	0.042	0.032
Ile_85	m+0	0.296	0.288	Ile_85	m+0	0.293	0.294
	m+1	0.437	0.448		m+1	0.440	0.444
	m+2	0.230	0.221		m+2	0.222	0.218
	m+3	0.041	0.038		m+3	0.041	0.038
	m+4	0.002	0.003		m+4	0.003	0.002
	m+5	-0.006	0.000		m+5	0.000	0.000
Ile_159	m+0	0.294	0.288	Ile_159	m+0	0.294	0.294
	m+1	0.430	0.448		m+1	0.445	0.444
	m+2	0.231	0.221		m+2	0.220	0.218
	m+3	0.041	0.038		m+3	0.039	0.038
	m+4	0.003	0.003		m+4	0.002	0.002
	m+5	0.002	0.000		m+5	0.000	0.000
Phe_57	m+0	0.271	0.257	Phe_57	m+0	0.279	0.278
	m+1	0.423	0.434		m+1	0.435	0.438
	m+2	0.249	0.246		m+2	0.234	0.231
	m+3	0.054	0.054		m+3	0.048	0.046
	m+4	0.004	0.005		m+4	0.004	0.003
	m+5	0.000	0.000		m+5	0.001	0.000
	m+6	0.000	0.000		m+6	0.000	0.000
	m+7	0.000	0.000		m+7	0.000	0.000
	m+8	0.000	0.000		m+8	0.000	0.000
	m+9	0.000	0.000		m+9	0.971	0.950
Phe_85	m+0	0.272	0.262	Phe_85	m+0	0.028	0.046
	m+1	0.424	0.437		m+1	0.001	0.002
	m+2	0.250	0.243		m+2	0.278	0.272
	m+3	0.052	0.050		m+3	0.437	0.435
	m+4	0.003	0.004		m+4	0.235	0.235
	m+5	0.000	0.000		m+5	0.048	0.049
	m+6	0.000	0.000		m+6	0.003	0.004
	m+7	-0.001	0.000		m+7	0.000	0.000

	m+8	0.000	0.000		m+8	0.000	0.000
Phe_159	m+0	0.272	0.262	Phe_159	m+0	0.000	0.000
	m+1	0.421	0.437		m+1	0.000	0.000
	m+2	0.249	0.243		m+2	0.000	0.000
	m+3	0.054	0.050		m+3	0.278	0.278
	m+4	0.004	0.004		m+4	0.437	0.438
	m+5	0.000	0.000		m+5	0.236	0.231
	m+6	0.000	0.000		m+6	0.046	0.046
	m+7	0.000	0.000		m+7	0.003	0.003
	m+8	0.000	0.000		m+8	0.000	0.000
Phe_302	m+0	0.970	0.952	Phe_302	m+0	0.000	0.000
	m+1	0.029	0.046		m+1	0.000	0.000
	m+2	0.001	0.002		m+2	0.000	0.000
Ser_57	m+0	0.588	0.584	Ser_57	m+0	0.617	0.615
	m+1	0.402	0.399		m+1	0.381	0.377
	m+2	0.010	0.015		m+2	0.003	0.008
	m+3	0.000	0.001		m+3	0.607	0.603
	m+4	0.597	0.596		m+4	0.384	0.381
	m+5	0.399	0.395		m+5	0.009	0.015
	m+6	0.005	0.008		m+6	0.000	0.000
Ser_159	m+0	0.599	0.596	Ser_159	m+0	0.617	0.615
	m+1	0.398	0.395		m+1	0.378	0.377
	m+2	0.003	0.008		m+2	0.005	0.008
Thr_57	m+0	0.444	0.437	Thr_57	m+0	0.432	0.432
	m+1	0.438	0.435		m+1	0.438	0.436
	m+2	0.111	0.114		m+2	0.122	0.120
	m+3	0.007	0.011		m+3	0.008	0.010
	m+4	0.000	0.000		m+4	0.000	0.000
Val_57	m+0	0.345	0.342	Val_57	m+0	0.366	0.359
	m+1	0.465	0.470		m+1	0.468	0.465
	m+2	0.183	0.175		m+2	0.159	0.164
	m+3	0.008	0.010		m+3	0.006	0.009
	m+4	0.000	0.000		m+4	0.000	0.000
	m+5	0.000	0.000		m+5	0.000	0.000
Val_85	m+0	0.348	0.349	Val_85	m+0	0.371	0.369
	m+1	0.460	0.473		m+1	0.464	0.466

m+2	0.185	0.169
m+3	0.007	0.007
m+4	0.000	0.000

---

m+2	0.160	0.157
m+3	0.006	0.006
m+4	0.000	0.000

---

付録表 2-3 コントロール株および改変株の最良適合値および95%信頼区間

反応	コントロール株		改変株	
	最良適合値	95%信頼区間	最良適合値	95%信頼区間
G6P-->F6P	64.1	62.8 to 72.0	58.7	57.5 to 68.4
F6P-->FBP	82.9	81.5 to 85.3	80.2	79.2 to 84.0
FBP-->DHAP+GAP	82.9	81.6 to 85.4	80.3	79.2 to 84.2
DHAP-->GAP	82.2	80.9 to 84.8	79.4	78.4 to 83.2
GAP-->PGA	173.8	172.3 to 176.3	170.4	169.4 to 174.4
PGA-->PEP	165.5	164.1 to 167.9	161.6	160.5 to 165.6
PEP-->Pyr	43.3	42.1 to 49.0	42.8	39.7 to 48.2
Pyr-->AcCOA+CO2in	127.7	127.5 to 133.7	126.9	123.7 to 132.3
AcCOA+Oxa-->IsoCit	54.6	54.2 to 57.4	34.1	33.4 to 37.4
IsoCit-->aKG+CO2in	54.6	48.9 to 57.4	30.8	27.3 to 37.3
aKG-->Suc+CO2in	48.6	43.0 to 51.4	24.4	21.0 to 31.0
Suc-->Fum	46.1	45.5 to 48.9	26.7	26.1 to 30.1
Fum-->Mal	46.1	45.7 to 48.9	26.7	26.2 to 30.0
Mal-->Oxa	46.1	45.9 to 51.9	30.0	26.7 to 35.4
IsoCit+AcCOA-->Mal+Suc	0	0 to 5.4	3.3	0.2 to 6.7
PEP+CO2in-->Oxa	18.3	13.0 to 18.3	14.6	11.1 to 17.9
G6P-->m6PG	34.8	26.9 to 36.0	40.1	29.7 to 41.3
m6PG-->Ru5P+CO2in	34.8	26.2 to 36.0	39.3	29.2 to 41.2
Ru5P-->R5P	15.5	12.7 to 16.0	17.3	14.0 to 18.0
Ru5P-->Xu5P	19.2	13.5 to 20.0	22.0	15.3 to 22.9
R5P+Xu5P-->S7P+GAP	10.6	7.8 to 11.0	12.1	8.7 to 12.6
GAP+S7P-->F6P+E4P	10.6	7.8 to 11.2	12.0	8.7 to 12.6
E4P+Xu5P-->F6P+GAP	8.6	5.8 to 9.2	9.9	6.6 to 10.5
m6PG-->Pyr+GAP	0	0 to 2.1	0.8	0.0 to 2.4

各株のグルコースの取込速度(コントロール株; 7.74 mmol/gDCW/h、改変株; 8.21 mmol/gDCW/h)を100に正規化している。

付録表 3-1 コントロール株および改変株の代謝モデル

代謝反応	炭素骨格移動
RUBP + CO <sub>2</sub> in --> {2}3PG	ABCDE + F --> CDE + FBA
3PG <--> GAP	ABC <--> ABC
GAP <--> DHAP	ABC <--> ABC
DHAP + GAP <--> FBP	CBA + DEF <--> ABCDEF
FBP --> F6P	ABCDEF --> ABCDEF
F6P <--> G6P	ABCDEF <--> ABCDEF
G6P --> 6PG	ABCDEF --> ABCDEF
6PG --> RU5P + CO <sub>2</sub> in	ABCDEF --> BCDEF + A
RU5P <--> X5P	ABCDE <--> ABCDE
RU5P <--> R5P	ABCDE <--> ABCDE
R5P + X5P <--> S7P + GAP	ABCDE + FGHIJ <--> FGABCDE + HIJ
E4P + X5P <--> F6P + GAP	ABCD + EFGHI <--> EFABCD + GHI
GAP + S7P <--> F6P + E4P	ABC + DEFGHIJ <--> DEFABC + GHIJ
DHAP + E4P --> S7P	ABC + DEFG --> CBADEFG
3PG <--> PEP	ABC <--> ABC
PEP <--> PYR	ABC <--> ABC
PYR --> AcCoA + CO <sub>2</sub> in	ABC --> BC + A
AcCoA + OXA --> IsoCIT	AB + CDEF --> FEDBAC
IsoCIT --> AKG + CO <sub>2</sub> in	ABCDEF --> ABCDE+F
PEP + CO <sub>2</sub> in --> OXA	ABC + D --> ABCD
MAL --> PYR + CO <sub>2</sub> in	ABCD --> ABC + D
SUC <--> FUM	ABCD <--> ABCD
FUM <--> MAL	ABCD <--> ABCD
OXA --> FUM	ABCD --> ABCD
Glycogen <--> G6P	ABCDEF <--> ABCDEF
AcCoA --> BuOH	nd

付録表 3-2 コントロール株および改変株の実測および推定 MID

コントロール株					改変株							
時間	代謝物	質量	実測値	推定値	時間	代謝物	質量	実測値	推定値			
0分目	F6P	m+0	1	1	F6P	m+0	1	1	F6P	m+0	1	1
		m+1	0	0		m+1	0	0		m+1	0	0
		m+2	0	0		m+2	0	0		m+2	0	0
		m+3	0	0		m+3	0	0		m+3	0	0
		m+4	0	0		m+4	0	0		m+4	0	0
		m+5	0	0		m+5	0	0		m+5	0	0
		m+6	0	0		m+6	0	0		m+6	0	0
	G6P	m+0	1	1	G6P	m+0	1	1	G6P	m+0	1	1
		m+1	0	0		m+1	0	0		m+1	0	0
		m+2	0	0		m+2	0	0		m+2	0	0
		m+3	0	0		m+3	0	0		m+3	0	0
		m+4	0	0		m+4	0	0		m+4	0	0
		m+5	0	0		m+5	0	0		m+5	0	0
		m+6	0	0		m+6	0	0		m+6	0	0
	MAL	m+0	1	1	MAL	m+0	1	1	MAL	m+0	1	1
		m+1	0	0		m+1	0	0		m+1	0	0
		m+2	0	0		m+2	0	0		m+2	0	0
		m+3	0	0		m+3	0	0		m+3	0	0
	PEP	m+0	1	1	PEP	m+0	1	1	PEP	m+0	1	1
		m+1	0	0		m+1	0	0		m+1	0	0
		m+2	0	0		m+2	0	0		m+2	0	0
		m+3	0	0		m+3	0	0		m+3	0	0
	S7P	m+0	1	1	S7P	m+0	1	1	S7P	m+0	1	1
		m+1	0	0		m+1	0	0		m+1	0	0
m+2		0	0	m+2		0	0	m+2		0	0	
m+3		0	0	m+3		0	0	m+3		0	0	
m+4		0	0	m+4		0	0	m+4		0	0	
m+5		0	0	m+5		0	0	m+5		0	0	
m+6		0	0	m+6		0	0	m+6		0	0	
m+7		0	0	m+7		0	0	m+7		0	0	
SUC	m+0	1	1	SUC	m+0	1	1	SUC	m+0	1	1	
	m+1	0	0		m+1	0	0		m+1	0	0	

		m+2	0	0			m+2	0	0
		m+3	0	0			m+3	0	0
		m+4	0	0			m+4	0	0
		m+0	0.196	0.105			m+0	0.488	0.422
		m+1	0.269	0.310			m+1	0.329	0.410
		m+2	0.294	0.336			m+2	0.141	0.141
	F6P	m+3	0.164	0.184		F6P	m+3	0.036	0.024
		m+4	0.064	0.056			m+4	0.006	0.002
		m+5	0.011	0.009			m+5	0.000	0.000
		m+6	0.002	0.001			m+6	0.000	0.000
		m+0	0.185	0.105			m+0	0.499	0.422
		m+1	0.269	0.310			m+1	0.307	0.410
		m+2	0.298	0.336			m+2	0.147	0.141
	G6P	m+3	0.168	0.184		G6P	m+3	0.041	0.024
		m+4	0.065	0.056			m+4	0.006	0.002
		m+5	0.012	0.009			m+5	0.001	0.000
		m+6	0.003	0.001			m+6	0.000	0.000
		m+0	0.971	0.993			m+0	0.999	0.995
		m+1	0.010	0.004			m+1	0.000	0.004
	MAL	m+2	0.007	0.003		MAL	m+2	0.001	0.001
		m+3	0.002	0.001			m+3	0.000	0.000
		m+4	0.010	0.000			m+4	0.000	0.000
		m+0	0.262	0.247			m+0	0.505	0.587
		m+1	0.491	0.488			m+1	0.419	0.366
	PEP	m+2	0.176	0.230		PEP	m+2	0.068	0.045
		m+3	0.071	0.035			m+3	0.007	0.002
		m+0	0.145	0.073			m+0	0.378	0.377
		m+1	0.233	0.247			m+1	0.350	0.412
		m+2	0.306	0.328			m+2	0.213	0.170
		m+3	0.177	0.230			m+3	0.044	0.037
	S7P	m+4	0.094	0.095		S7P	m+4	0.011	0.005
		m+5	0.036	0.023			m+5	0.004	0.000
		m+6	0.006	0.003			m+6	0.000	0.000
		m+7	0.004	0.000			m+7	0.000	0.000
		m+0	0.994	0.993			m+0	0.998	0.995
		m+1	0.001	0.004			m+1	0.000	0.004
	SUC	m+2	0.000	0.003		SUC	m+2	0.000	0.001

		m+3	0.000	0.001			m+3	0.000	0.000
		m+4	0.005	0.000			m+4	0.001	0.000
		m+0	0.102	0.019			m+0	0.309	0.219
		m+1	0.104	0.109			m+1	0.284	0.387
		m+2	0.214	0.256			m+2	0.243	0.273
	F6P	m+3	0.271	0.314		F6P	m+3	0.118	0.099
		m+4	0.205	0.214			m+4	0.041	0.020
		m+5	0.085	0.077			m+5	0.005	0.002
		m+6	0.019	0.012			m+6	0.000	0.000
		m+0	0.092	0.019			m+0	0.293	0.219
		m+1	0.107	0.109			m+1	0.281	0.387
		m+2	0.227	0.256			m+2	0.247	0.272
	G6P	m+3	0.259	0.314		G6P	m+3	0.132	0.099
		m+4	0.202	0.214			m+4	0.042	0.020
		m+5	0.089	0.077			m+5	0.006	0.002
		m+6	0.022	0.012			m+6	0.000	0.000
		m+0	0.981	0.984			m+0	0.990	0.988
		m+1	0.001	0.006			m+1	0.010	0.008
	MAL	m+2	0.005	0.006		MAL	m+2	0.000	0.003
		m+3	0.005	0.003			m+3	0.000	0.000
		m+4	0.007	0.001			m+4	0.000	0.000
		m+0	0.132	0.111			m+0	0.342	0.433
		m+1	0.389	0.379			m+1	0.454	0.434
	PEP	m+2	0.298	0.384		PEP	m+2	0.168	0.122
		m+3	0.181	0.126			m+3	0.036	0.011
		m+0	0.107	0.010			m+0	0.228	0.174
		m+1	0.077	0.066			m+1	0.280	0.352
		m+2	0.184	0.185			m+2	0.290	0.296
		m+3	0.208	0.286			m+3	0.128	0.135
	S7P	m+4	0.209	0.262		S7P	m+4	0.059	0.036
		m+5	0.153	0.143			m+5	0.015	0.006
		m+6	0.051	0.043			m+6	0.000	0.001
		m+7	0.010	0.006			m+7	0.000	0.000
		m+0	0.985	0.984			m+0	0.989	0.988
		m+1	0.012	0.006			m+1	0.010	0.008
	SUC	m+2	0.000	0.006		SUC	m+2	0.000	0.003

		m+3	0.001	0.003			m+3	0.000	0.000
		m+4	0.002	0.001			m+4	0.000	0.000
		m+0	0.103	0.006			m+0	0.234	0.136
		m+1	0.061	0.048			m+1	0.237	0.325
		m+2	0.150	0.163			m+2	0.272	0.319
	F6P	m+3	0.246	0.293		F6P	m+3	0.173	0.165
		m+4	0.245	0.296			m+4	0.070	0.047
		m+5	0.148	0.159			m+5	0.014	0.007
		m+6	0.047	0.035			m+6	0.000	0.000
		m+0	0.086	0.006			m+0	0.229	0.137
		m+1	0.055	0.048			m+1	0.239	0.325
		m+2	0.153	0.163			m+2	0.264	0.319
	G6P	m+3	0.243	0.293		G6P	m+3	0.182	0.164
		m+4	0.258	0.296			m+4	0.072	0.047
		m+5	0.157	0.159			m+5	0.014	0.007
		m+6	0.048	0.035			m+6	0.000	0.000
		m+0	0.978	0.976			m+0	0.994	0.981
		m+1	0.010	0.008			m+1	0.000	0.012
	MAL	m+2	0.002	0.009		MAL	m+2	0.005	0.005
3 分目		m+3	0.006	0.006	3 分目		m+3	0.001	0.001
		m+4	0.005	0.002			m+4	0.000	0.000
		m+0	0.086	0.068			m+0	0.273	0.350
		m+1	0.297	0.300			m+1	0.452	0.447
	PEP	m+2	0.367	0.430		PEP	m+2	0.226	0.179
		m+3	0.250	0.203			m+3	0.049	0.023
		m+0	0.145	0.003			m+0	0.166	0.100
		m+1	0.022	0.024			m+1	0.220	0.274
		m+2	0.100	0.097			m+2	0.287	0.320
		m+3	0.153	0.218			m+3	0.178	0.206
	S7P	m+4	0.231	0.294		S7P	m+4	0.106	0.079
		m+5	0.211	0.238			m+5	0.034	0.018
		m+6	0.103	0.106			m+6	0.009	0.002
		m+7	0.034	0.020			m+7	0.000	0.000
		m+0	0.987	0.976			m+0	0.980	0.981
		m+1	0.007	0.008			m+1	0.019	0.012
	SUC	m+2	0.001	0.009		SUC	m+2	0.000	0.005
		m+3	0.001	0.006			m+3	0.001	0.001

		m+4	0.003	0.002			m+4	0.000	0.000
		m+0	0.082	0.003			m+0	0.221	0.097
		m+1	0.041	0.028			m+1	0.209	0.278
		m+2	0.123	0.117			m+2	0.266	0.329
	F6P	m+3	0.218	0.259		F6P	m+3	0.199	0.207
		m+4	0.288	0.322			m+4	0.084	0.073
		m+5	0.189	0.213			m+5	0.021	0.014
		m+6	0.059	0.059			m+6	0.000	0.001
		m+0	0.070	0.003			m+0	0.216	0.098
		m+1	0.036	0.028			m+1	0.218	0.278
		m+2	0.117	0.117			m+2	0.267	0.329
	G6P	m+3	0.227	0.259		G6P	m+3	0.195	0.207
		m+4	0.283	0.322			m+4	0.086	0.073
		m+5	0.202	0.213			m+5	0.019	0.014
		m+6	0.065	0.059			m+6	0.000	0.001
		m+0	0.979	0.967			m+0	0.992	0.974
		m+1	0.004	0.009			m+1	0.000	0.016
	MAL	m+2	0.007	0.012		MAL	m+2	0.005	0.008
4 分目		m+3	0.007	0.009	4 分目		m+3	0.000	0.002
		m+4	0.002	0.003			m+4	0.003	0.000
		m+0	0.066	0.049			m+0	0.242	0.301
		m+1	0.245	0.257			m+1	0.445	0.448
	PEP	m+2	0.394	0.442		PEP	m+2	0.254	0.217
		m+3	0.294	0.252			m+3	0.059	0.035
		m+0	0.099	0.001			m+0	0.153	0.067
		m+1	0.018	0.012			m+1	0.189	0.222
		m+2	0.074	0.061			m+2	0.293	0.313
		m+3	0.139	0.170			m+3	0.188	0.246
	S7P	m+4	0.223	0.282		S7P	m+4	0.122	0.115
		m+5	0.246	0.281			m+5	0.044	0.032
		m+6	0.168	0.155			m+6	0.011	0.005
		m+7	0.033	0.037			m+7	0.000	0.000
		m+0	0.977	0.967			m+0	0.967	0.974
		m+1	0.011	0.009			m+1	0.025	0.016
	SUC	m+2	0.005	0.012		SUC	m+2	0.003	0.008
		m+3	0.003	0.009			m+3	0.002	0.002

		m+4	0.004	0.003			m+4	0.003	0.000
		m+0	0.089	0.002			m+0	0.226	0.077
		m+1	0.032	0.020			m+1	0.214	0.247
		m+2	0.098	0.095			m+2	0.257	0.329
	F6P	m+3	0.211	0.235		F6P	m+3	0.198	0.233
		m+4	0.283	0.328			m+4	0.087	0.093
		m+5	0.217	0.244			m+5	0.019	0.020
		m+6	0.069	0.076			m+6	0.000	0.002
		m+0	0.076	0.002			m+0	0.216	0.077
		m+1	0.029	0.020			m+1	0.207	0.247
		m+2	0.099	0.095			m+2	0.250	0.329
	G6P	m+3	0.208	0.235		G6P	m+3	0.211	0.233
		m+4	0.293	0.328			m+4	0.093	0.093
		m+5	0.219	0.244			m+5	0.023	0.020
		m+6	0.076	0.076			m+6	0.000	0.002
		m+0	0.976	0.959			m+0	0.976	0.966
		m+1	0.000	0.010			m+1	0.012	0.019
	MAL	m+2	0.011	0.015		MAL	m+2	0.007	0.011
5 分目		m+3	0.006	0.012	5 分目		m+3	0.003	0.003
		m+4	0.007	0.004			m+4	0.003	0.000
		m+0	0.058	0.041			m+0	0.222	0.271
		m+1	0.223	0.234			m+1	0.442	0.445
	PEP	m+2	0.401	0.444		PEP	m+2	0.272	0.241
		m+3	0.319	0.281			m+3	0.064	0.043
		m+0	0.104	0.001			m+0	0.163	0.051
		m+1	0.020	0.008			m+1	0.182	0.189
		m+2	0.066	0.046			m+2	0.285	0.301
		m+3	0.124	0.144			m+3	0.179	0.266
	S7P	m+4	0.221	0.268		S7P	m+4	0.129	0.141
		m+5	0.248	0.299			m+5	0.050	0.045
		m+6	0.178	0.185			m+6	0.012	0.008
		m+7	0.039	0.049			m+7	0.000	0.001
		m+0	0.957	0.959			m+0	0.951	0.966
		m+1	0.020	0.010			m+1	0.039	0.019
	SUC	m+2	0.015	0.015		SUC	m+2	0.008	0.011
		m+3	0.005	0.012			m+3	0.002	0.003

m+4 0.002 0.004

m+4 0.000 0.000

付録表 3-3 コントロール株および改変株の代謝物濃度

代謝物名	μmol/gDCW	
	コントロール株	改変株
G6P	11	30
F6P	0.5	3.0
FBP	1.3	0.7
DHAP	0.4	0.6
GAP	1.8	8.1
6PG	26	126
RU5P	0.3	0.8
R5P	0.2	0.6
X5P	0.3	6.3
S7P	3.7	6.9
E4P	0.01	5.6
RUBP	0.2	0.6
3PG	43	72
PEP	97	172
PYR	5.8	5.8
AcCoA	0.1	0.1
IsoCIT	0.1	0.1
AKG	0.2	0.1
SUC	5.0	1.9
FUM	0.1	0.1
MAL	0.3	0.3
OXA	0.1	0.1

付録表 4-1 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の代謝モデル

代謝反応	炭素骨格移動
Subs_Glc --> G6P	ABCDEF --> ABCDEF
G6P <--> F6P	ABCDEF <--> ABCDEF
F6P <--> DHAP + GAP	ABCDEF <--> CBA + DEF
DHAP <--> GAP	ABC <--> ABC
GAP <--> PGA	ABC <--> ABC
PGA <--> PEP	ABC <--> ABC
G6P --> RU5P + CO2_in	ABCDEF --> BCDEF + A
RU5P <--> X5P	ABCDE <--> ABCDE
RU5P <--> R5P	ABCDE <--> ABCDE
RU5P --> PGA + CFint	ABCDE --> CDE + AB
CFint + CO2_in --> PGA	AB + C --> CBA
R5P + X5P <--> S7P + GAP	ABCDE + FGHIJ <--> FGABCDE + HIJ
GAP + S7P <--> F6P + E4P	ABC + DEFGHIJ --> DEFABC + GHIJ
E4P + X5P <--> F6P + GAP	ABCD + EFGHI --> EFABCD + GHI
PEP --> PYR	ABC --> ABC
PYR --> AcCoA + CO2_in	ABC --> BC + A
AcCoA + OXA --> IsoCit	AB + CDEF --> FEDBAC
IsoCIT --> AKG + CO2_in	ABCDEF --> ABCDE + F
AKG --> Sym_SUC + CO2_in	ABCDE --> BCDE + A
SUC <--> MAL	ABCD --> ABCD
MAL <--> OXA	ABCD --> ABCD
MAL --> PYR + CO2_in	ABCD --> ABC + D
PEP + CO2_in --> OXA	ABC + D --> ABCD
IsoCit + AcCoA --> MAL + Sym_SUC	ABCDEF + GH --> ABHG + FCDE
PGA --> preSer	ABC --> ABC
preSer <--> preGly + THF_in	ABC --> AB + C
Subs_Glc --> G6P	ABCDEF --> ABCDEF
G6P <--> F6P	ABCDEF <--> ABCDEF

付録表 4-2 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の実測および推定 MID

コントロール株				改変株			
フラグメント	質量	実測値	予測値	フラグメント	質量	実測値	予測値
Ala_57	m+0	0.696	0.710	Ala_57	m+0	0.634	0.633
	m+1	0.038	0.033		m+1	0.059	0.061
	m+2	0.263	0.254		m+2	0.301	0.297
	m+3	0.003	0.003		m+3	0.006	0.009
Ala_85	m+0	0.704	0.718	Ala_85	m+0	0.640	0.646
	m+1	0.031	0.025		m+1	0.055	0.056
	m+2	0.265	0.256		m+2	0.305	0.299
Asp_57	m+0	0.707	0.695	Asp_57	m+0	0.627	0.622
	m+1	0.037	0.047		m+1	0.062	0.065
	m+2	0.254	0.249		m+2	0.304	0.297
	m+3	0.004	0.008		m+3	0.008	0.015
	m+4	-0.001	0.000		m+4	0.000	0.001
Asp_85	m+0	0.716	0.706	Asp_85	m+0	0.638	0.635
	m+1	0.028	0.037		m+1	0.055	0.058
	m+2	0.256	0.252		m+2	0.304	0.298
	m+3	0.000	0.004		m+3	0.003	0.009
Asp159	m+0	0.709	0.706	Asp159	m+0	0.630	0.635
	m+1	0.030	0.037		m+1	0.054	0.058
	m+2	0.254	0.252		m+2	0.305	0.298
	m+3	0.007	0.004		m+3	0.010	0.009
Asp_302	m+0	0.729	0.720	Asp_302	m+0	0.661	0.663
	m+1	0.271	0.276		m+1	0.333	0.324
	m+2	0.000	0.004		m+2	0.006	0.014
Glu_57	m+0	0.513	0.507	Glu_57	m+0	0.406	0.410
	m+1	0.043	0.044		m+1	0.068	0.073
	m+2	0.360	0.363		m+2	0.390	0.385
	m+3	0.016	0.019		m+3	0.036	0.040
	m+4	0.068	0.065		m+4	0.099	0.090
	m+5	0.000	0.001		m+5	0.001	0.003
Glu_85	m+0	0.517	0.516	Glu_85	m+0	0.409	0.418
	m+1	0.041	0.036		m+1	0.062	0.069
	m+2	0.362	0.369		m+2	0.399	0.391
	m+3	0.013	0.013		m+3	0.030	0.032

	m+4	0.068	0.066		m+4	0.100	0.090
Glu_159	m+0	0.520	0.516	Glu_159	m+0	0.412	0.418
	m+1	0.038	0.036		m+1	0.063	0.069
	m+2	0.362	0.369		m+2	0.395	0.391
	m+3	0.012	0.013		m+3	0.031	0.032
	m+4	0.068	0.066		m+4	0.100	0.090
Phe_302	m+0	0.746	0.727	Phe_302	m+0	0.675	0.669
	m+1	0.256	0.270		m+1	0.321	0.325
	m+2	-0.003	0.003		m+2	0.003	0.007
Gly_57	m+0	0.717	0.727	Gly_57	m+0	0.667	0.669
	m+1	0.280	0.270		m+1	0.327	0.325
	m+2	0.003	0.003		m+2	0.006	0.007
Gly_85	m+0	0.725	0.736	Gly_85	m+0	0.674	0.681
	m+3	0.275	0.264		m+3	0.326	0.319
Ile_85	m+0	0.501	0.507	Ile_85	m+0	0.393	0.410
	m+1	0.051	0.044		m+1	0.092	0.073
	m+2	0.356	0.363		m+2	0.355	0.385
	m+3	0.022	0.019		m+3	0.063	0.040
	m+4	0.069	0.065		m+4	0.088	0.090
	m+5	0.001	0.001		m+5	0.010	0.003
Ile_159	m+0	0.503	0.507	Ile_159	m+0	0.395	0.410
	m+1	0.048	0.044		m+1	0.090	0.073
	m+2	0.353	0.363		m+2	0.354	0.385
	m+3	0.022	0.019		m+3	0.063	0.040
	m+4	0.068	0.065		m+4	0.088	0.090
	m+5	0.006	0.001		m+5	0.011	0.003
Leu_85	m+0	0.372	0.375	Leu_85	m+0	0.296	0.280
	m+1	0.162	0.168		m+1	0.173	0.185
	m+2	0.274	0.278		m+2	0.275	0.285
	m+3	0.114	0.110		m+3	0.149	0.150
	m+4	0.056	0.051		m+4	0.073	0.071
	m+5	0.022	0.018		m+5	0.034	0.029
Ser_57	m+0	0.685	0.691	Ser_57	m+0	0.626	0.624
	m+1	0.070	0.070		m+1	0.084	0.086
	m+2	0.244	0.235		m+2	0.286	0.284
	m+3	0.001	0.003		m+3	0.003	0.006

Ser_85	m+0	0.691	0.700	Ser_85	m+0	0.631	0.635
	m+1	0.063	0.063		m+1	0.075	0.076
	m+2	0.245	0.237		m+2	0.294	0.289
Ser_159	m+0	0.695	0.700	Ser_159	m+0	0.638	0.635
	m+1	0.064	0.063		m+1	0.080	0.076
	m+2	0.241	0.237		m+2	0.282	0.289
Val_57	m+0	0.506	0.510	Val_57	m+0	0.431	0.408
	m+1	0.044	0.042		m+1	0.064	0.075
	m+2	0.361	0.365		m+2	0.378	0.384
	m+3	0.018	0.017		m+3	0.032	0.041
	m+4	0.071	0.065		m+4	0.093	0.089
	m+5	0.000	0.001		m+5	0.002	0.003
Tyr_302	m+0	0.739	0.727	Tyr_302	m+0	0.677	0.669
	m+1	0.263	0.270		m+1	0.320	0.325
	m+2	-0.002	0.003		m+2	0.003	0.007
Thr_57	m+0	0.714	0.695	Thr_57	m+0	0.640	0.622
	m+1	0.036	0.047		m+1	0.056	0.065
	m+2	0.248	0.249		m+2	0.298	0.297
	m+3	0.003	0.008		m+3	0.006	0.015
	m+4	0.000	0.000		m+4	0.000	0.001
Thr_85	m+0	0.724	0.706	Thr_85	m+0	0.651	0.635
	m+1	0.028	0.037		m+1	0.052	0.058
	m+2	0.249	0.252		m+2	0.295	0.298
	m+3	-0.001	0.004		m+3	0.001	0.009

## 略称一覽

---

### 代謝経路

略称	正式名称
EMP 経路	Embden-Meyerhof-Parnas pathway
PP 経路	Pentose-phosphate pathway
ED 経路	Entner-Doudoroff pathway
TCA 回路	Tricarboxylic acid cycle
CBB 回路	Calvin-Benson-Bessham cycle

---

---

### 代謝物名

略称	正式名称
G6P	Glucose 6-phosphate
F6P	Fructose 6-phosphate
FBP	Fructose 1,6-bisphosphate
DHAP	Dihydroxyaceton phosphate
GAP	Glyceraldehyde 3-phosphate
BPG	1,3-bisphosphoglycerate
3PG	3-phosphoglycerate
2PG	2-phosphoglycerate
PEP	Phosphoenolpyruvate
PYR	Pyruvate
AcCoA	Acetyl-Coenzyme A
CIT	Citrate
IsoCIT	Isocitrate
AKG	Alpha ketoglutarate
SUC	Succinate
SUCCoA	Succinyl-Coenzyme A
FUM	Fumarate
MAL	Malate
OXA	Oxaloacetate
GOA	Glyoxarate

---

6PG	6-phosphoglycerate
RU5P	Ribulose 5-phosphate
R5P	Ribose 5-phosphate
X5P	Xylulose 5-phosphate
S7P	Sedoheptulose 7-phosphate
E4P	Erythrose 4-phosphate
RUBP	Ribulose 1,5-bisphosphate
MVA	Mevalonate
BuOH	<i>n</i> -Butanol
Ala	Alanine
Asp	Aspartic acid
Glu	Glutamic acid
Phe	Phenylalanine
Gly	Glycine
Ile	Isoleucine
Leu	Leucine
Ser	Serine
Thr	Threonine
Val	Valine
ATP	Adenosine triphosphate
ADP	Adenosine diphosphate
AMP	Adenosine monophosphate
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adenine dinucleotide (Oxidized form)
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (Reduced form)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Oxidized form)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Reduced form)
FAD	Flavin adenine dinucleotide (Oxidized form)
FADH <sub>2</sub>	Flavin adenine dinucleotide (Reduced form)
その他	正式名称
<sup>13</sup> C-MFA	<sup>13</sup> C-metabolic flux analysis
FBA	Flux balance analysis

GC	Gas chromatography
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
LC-MS/MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
HPLC	High performance liquid chromatography
MID	Mass isotopomer distribution
EMU	Elementary metabolite unit
DCW	Dry cell weight
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
MTBSTFA	<i>N-tert</i> -butyldimethylsilyl- <i>N</i> -methyltrifluoroacetamide
TBDMS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
FNR	Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> reductase

---

## 謝辞

本研究の遂行に当たり、博士課程からの入学を認めて下さったこと、また魅力的なテーマと研究の場および他グループとの共同研究などの機会を与えて下さり、多数のご指導・ご助言を賜りました清水浩教授に謹んで感謝の意を表します。

博士論文審査委員として有益なご指導・ご助言を頂きました大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻の前田太郎教授、松田秀雄教授、松田史生教授、および若宮直紀教授に心より感謝申し上げます。

実験手法や研究指導、論文執筆などの研究者としての基礎体力および心構えに関する多大なご指導・ご助言を賜りました松田史生教授、研究全編に渡る  $^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析に関する有益なご議論・ご助言を賜りました戸谷吉博助教、およびシアノバクテリアの研究に関する有益なご議論・ご助言を賜りました豊島正和特任助教に厚く御礼申し上げます。

第3章について、LC-MS/MS を用いて中間代謝物質の  $^{13}\text{C}$  標識割合を分析していただきました、大阪大学大学院工学研究科の福崎英一郎教授および傳寶雄大博士、ならびにシアノバクテリアの培養方法をご教授いただきました Sastia Prama Putri 助教および Walter Alvarez Lavina 博士に厚く御礼申し上げます。

$^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析におけるプログラム作成および計算での多大なご助言、ご協力をいただきました岡橋伸幸博士および前田昂亮氏、プロテオーム解析でご協力をいただきました植林希代加氏に心より感謝申し上げます。

研究や将来のことに関する悩み、相談を聞いてくださいました鳥取大学工学部の大城隆教授、鈴木宏和准教授、および八木寿梓助教、大阪工業大学工学部の大島敏久教授、産業技術総合研究所の秋田紘長博士、慶應義塾大学環境情報学部の板谷光泰教授、ならびに九州大学農学部の土居克実教授に心より感謝申し上げます。

最後に、研究生生活において様々な面でお世話になりました代謝情報工学研究室のみなさま、私生活を支えて下さいました友人のみなさま、温かく見守って下さった和田家のみなさまに心から感謝致します。