



Title	クラブトリー効果における酵母代謝解析および Saccharomyces cerevisiaeの連続培養における対糖菌 体収率の向上
Author(s)	井村, 誠
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76214
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士学位論文

クラブトリー効果における酵母代謝解析および
Saccharomyces cerevisiae の連続培養における
対糖菌体収率の向上

井村 誠

2019 年 10 月

大阪大学大学院工学研究科

目次

第 1 章 緒論.....	1
1. 1. はじめに.....	1
1. 2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1. 3. <i>S. cerevisiae</i> のクラブトリー効果に関する先行研究.....	3
1. 4. クラブトリー効果を低減した先行研究.....	5
1. 4. 1. グルコース取り込みに関連する遺伝子.....	7
1. 4. 2. NAD ⁺ /NADH の比率を変化させる遺伝子.....	8
1. 4. 3. エタノール合成に関連する遺伝子.....	8
1. 5. 培養方法.....	11
1. 6. メタボロミクス.....	15
1. 7. 本論文の目的と構成.....	16
第 2 章クラブトリー陽性および陰性の差異に基づく酵母代謝プロファイルの比較.....	19
2. 1. 諸言.....	19
2. 2. 実験方法.....	20
2. 2. 1. 菌株および培養.....	20
2. 2. 2. 乾燥菌体重量、有機酸、グルコース、溶存酸素濃度の測定.....	20
2. 2. 3. 比速度の算出.....	21
2. 2. 4. メタボローム解析のための菌体の回収と代謝物の抽出.....	21
2. 2. 5. GC-MS 分析.....	22
2. 2. 6. LC-MS/MS 分析.....	23
2. 2. 7. 多変量解析.....	24
2. 2. 8. 解糖系とペントースリン酸経路のフラックスの決定.....	24
2. 2. 9. NADH の比生産速度の計算.....	25
2. 3. 実験結果.....	26
2. 3. 1. 回分培養の結果.....	26
2. 3. 2. <i>S. cerevisiae</i> と <i>C. utilis</i> のそれぞれの増殖期におけるメタボローム解析.....	29
2. 3. 3. 解糖系とペントースリン酸経路の分岐比の測定.....	35
2. 3. 4. NADH の比生産速度と比消費速度.....	35
2. 4. 考察.....	36
2. 5. 小括.....	40
第 3 章 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の連続培養におけるクラブトリー効果の低減.....	42
3. 1. 諸言.....	42
3. 2. 実験手法.....	43
3. 2. 1. 菌株および培養.....	44
3. 2. 2. バイオマスおよびエタノールの測定.....	44
3. 2. 3. メタボローム解析.....	44
3. 3. 実験結果.....	44

3. 3. 1. 増殖および培養結果.....	44
3. 3. 2. GC・MS によって同定されたメタボロームデータによる主成分分析	46
3. 3. 3. 代謝物を添加する候補の選択	49
3. 3. 4. 呼吸発酵代謝を行う希釈率での連続培養における候補代謝物の添加	51
3. 4. 考察	52
3. 5. 小括	56
第 4 章 総括.....	58
4. 1. 総括	58
4. 2 今後の展望	59
謝辞.....	62
引用文献	63
発表論文	75
付録.....	77

第 1 章 緒論

1. 1. はじめに

微生物や動植物等の生体機能を活用した物質変換プロセスであるバイオプロセスは化学プロセスと並んで商業生産において重要な役割を果たす。バイオプロセスにおける商業生産に向けた取り組みは生物の選定、生物の育種、培養条件の検討、スケールアップの順に進められる。これらの取り組みの中で、予期せぬ問題が生じることがある。この問題の一つに副生成物の蓄積がある。育種する際、多くの場合は目的物質の生産性を指標に検討される。結果として、培養条件の検討時に目的物質の目標生産濃度を達成しているにもかかわらず、副生成物が多く蓄積していることに気づくことも珍しくなく、これは糖あたりの目的物質の収率の低下を導く。従って、副生成物を低減させる試みは重要であり、実際には育種した生物に対して再度育種を行う、または培養条件の検討を行うことによって副生成物を低減させる。商業生産での問題となる主な副生成物の例として出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるエタノール生産 (1)、大腸菌による酢酸生産 (2)、乳酸菌による乳酸生産 (3) が知られている。本研究ではこれらの副生成物のうち、*S. cerevisiae* が生成されるエタノールの低減を培養条件を検討することによって実施した。具体的には効果が見込まれる代謝物を絞り込み、培地に添加することによって取り組んだ。

本章では、本研究の背景や目的について述べる。まず始めに好気条件における *Saccharomyces cerevisiae* を用いた商業生産においてクラブトリ効果を引き起こす問題について述べる。続いて、クラブトリ効果の解明を目的とした先行研究並びに *S. cerevisiae* においてクラブトリ効果を低減、回避するための育種事例、培養方法について言及する。その後、培養方法において代謝物の添加によってクラブトリ効果を低減するためにメタボロミクスが有効な手法であることを示す。最後に本研究の目的について説明する。

1. 2. *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae*はエタノール生産能を有している酵母として知られている（図 1. 1.）。そのため、*S. cerevisiae*は古来よりビールやワイン、清酒などの醸造やパンの製造に使用されており、我々の生活には欠かすことのできない酵母と言える。また、分子生物学分野においても、*S. cerevisiae*は真核生物のモデル生物として研究対象となっている。*S. cerevisiae*は真核生物として初めて全ゲノム塩基配列も決定されており（4）、遺伝子組換え技術に関しても他の酵母に比べて遥かに充実している。これらの理由から、*S. cerevisiae*は物質生産において有用な宿主と言え、様々な化合物において商業生産が始まっている。その一例としてバイオ燃料がある。近年では環境汚染や地球温暖化の問題から、環境に優しく、持続可能なエネルギーとして、化石燃料に取って代わってバイオ燃料に注目が集まっている。*S. cerevisiae*の優れたエタノール生産能を活用して、サトウキビやトウモロコシなどのバイオマスから加水分解された糖からエタノールの商業生産が世界中で実施されている（5）。他にも、乳酸やコハク酸、エチレンなどの化成品や、化粧品や潤滑油の原料として用いられるファルネセン、メラノーマ病に対する治療としてレスベラトロールなども *S. cerevisiae* の代謝改変を行うことによって商業生産をすることに成功している（6）。しかしながら、エタノール以外の化合物の製造を目指した際に、*S. cerevisiae*はある一定濃度以上のグルコースが存在すると、溶存酸素濃度が高いにも関わらず、酸素消費が制限される。この現象はクラブトリー効果と定義されており（7）、結果としてエタノールを生産し、糖あたりの目的物質に対する収率が低下するとともに、菌体そのものの生産収率も低下する。従って、クラブトリー効果は *S. cerevisiae* の物質生産の適応範囲を狭めている原因の一つと言える。

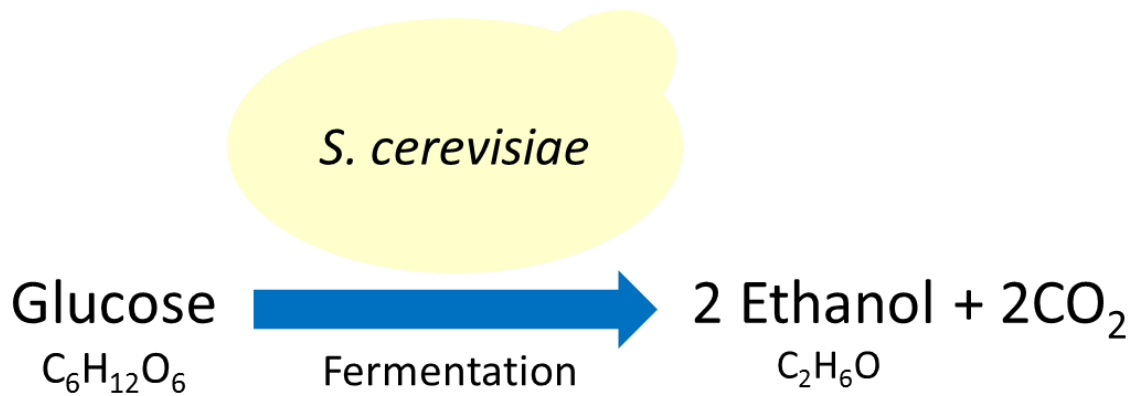


図 1. 1. *S. cerevisiae* によるグルコースを糖源としたエタノール発酵

1. 3. *S. cerevisiae* のクラブトリ効果に関する先行研究

クラブトリ効果とは酵母を培養する際にグルコースが一定濃度以上存在すると、酸素消費が抑制される現象である (7)。また、Ata らによればクラブトリ効果は酵母が好気条件で高い増殖速度で培養する際に、呼吸と発酵を同時に行うと定義されている (8)。それ故、*S. cerevisiae* のようなクラブトリ効果を示す酵母は十分な酸素濃度があるにも関わらず、低いグルコース濃度においてもアルコール発酵を行う。そのため、*S. cerevisiae* はクラブトリ効果によって、他の微生物の生育に阻害を与えるエタノールを生産する。加えて糖が枯渇した際にはエタノールを炭素源として再資化する (diauxic shift; 9)。これらは *S. cerevisiae* が自然界の生存競争で生き残るために獲得した有効な手法ととらえられている (10, 11)。先行研究により *S. cerevisiae* におけるクラブトリ効果は複数の要因が組み合わさり、誘導されていることが提唱されている (図 1. 2.) (12)。最も受け入れられている仮説は解糖系の酵素 (グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼやホスホグリセリン酸キナーゼ、ピルビン酸キナーゼ) とミトコンドリアの膜タンパク質が細胞質の ADP や無機リン酸を奪い合うことである (13, 14)。*S. cerevisiae* は他の酵母と比べてグルコースの比消費速度が高く (15)、グルコースの取り込みに応じて解糖系の酵素の発現が向上する (16)。それに伴い、解糖系での ADP や無機リン酸の使用量が多くなり、ミトコンドリアでの使用量

を上回る。ADP や無機リン酸は酸化リン酸化の基質であることから、ミトコンドリアでの ADP や無機リン酸が不足すると、酸化リン酸化は制限されてしまい、呼吸を阻害する。他にも、詳細なメカニズムについては明らかになっていないが、フルクコース 1, 6-ビスリン酸はミトコンドリアの複合体 III、IV の活性を低下させるため、呼吸を阻害する原因として報告されている (17)。続いてクラブトリー効果はピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性にも影響を与える。非発酵の炭素源を用いた場合にはピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体が活性化されることから、糖源として取り込んだ炭素が TCA サイクルに効率的に運ばれる (18)。一方で、グルコースのような発酵性の糖源を使用した場合、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体は転写制御を受けるため、サブユニット E3 の発現が低下する (19)。一方で前述の通り、グルコースのような発酵性の炭素源の取り込みに応じて解糖系酵素の発現が向上する。従って、解糖系酵素の活性がピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性を上回り、ピルビン酸が細胞内に蓄積する。こうして蓄積したピルビン酸はピルビン酸デカルボキシラーゼによってアセトアルデヒドに変換される (20)。更にアルコールデヒドロゲナーゼによってエタノールに還元されるが、この際に解糖系で過剰に蓄積した NADH は再酸化され、NAD⁺ を再生する (21)。

クラブトリー効果は TCA サイクルの酵素にも影響を与える。クラブトリー効果が誘導されると、アコニターゼやイソクエン酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼの活性が低下する。加えて、電子伝達系の複合体 II や IV の活性も同様に低下する。これらは転写レベルで抑制されることによって生じることが報告されている (22)。それ故、酸化リン酸化が十分に機能せず、酸素消費速度が低下する要因となっている。また、グルコースの取り込みに応じて、カルシウムイオンのミトコンドリアへの取り込みが増加した結果、カルシウムイオンが ATP 合成を阻害するため、呼吸の低下へと導くこともクラブトリー効果を誘導する原因として報告されている (23)。

このように、クラブトリー効果を引き起こす原因に関する先行研究は数多く報告さ

れているが、クラブトリー効果が誘導された結果、細胞内の代謝に及ぼした影響についての先行研究はない。クラブトリー効果が代謝に与えた変化を明らかにし、その変化を抑制する手法を施すことによって、クラブトリー効果を低減することが期待できる。従って、商業生産で課題となるクラブトリー効果を低減するために、クラブトリー効果によって生じた代謝の影響を理解することが重要であると言える。

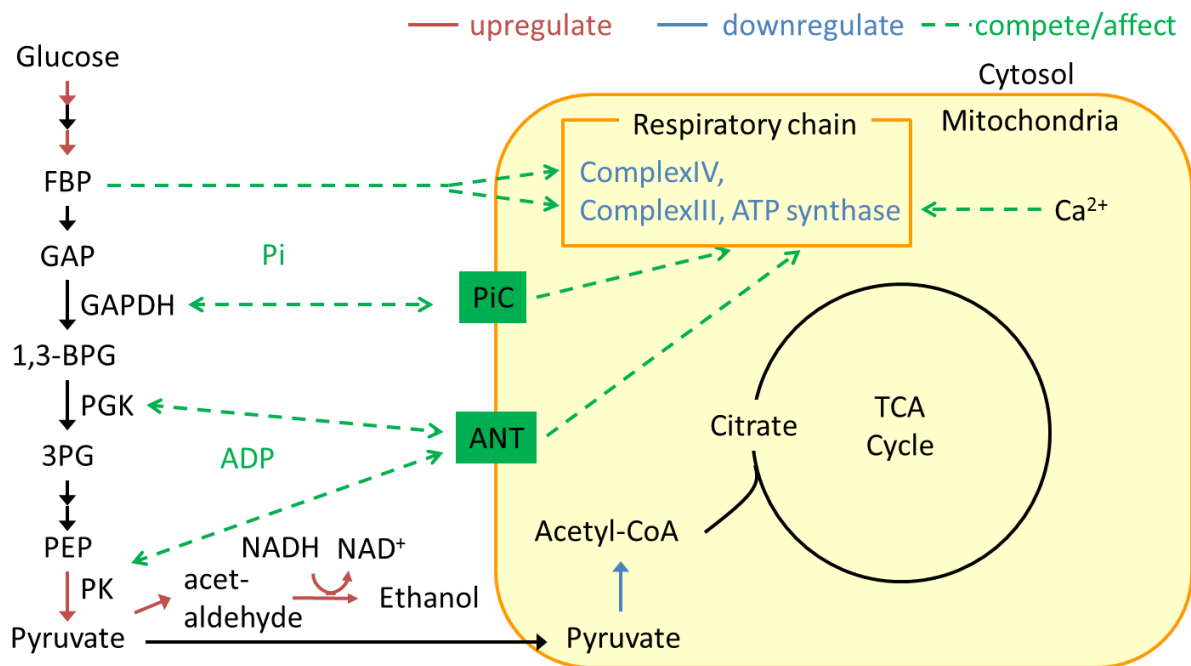


図 1. 2. *S. cerevisiae* のクラブトリー効果の誘導で報告のあるメカニズム. GAPDH: グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、PGK: ホスホグリセリン酸キナーゼ、PK: ピルビン酸キナーゼ、PiC: ミトコンドリアリン酸キャリア、ANT: アデニンヌクレオチドトランスロカーゼ

1. 4. クラブトリー効果を低減した先行研究

様々な要因が組み合わさり、*S. cerevisiae*におけるクラブトリー効果は誘導されていることが報告されるが、クラブトリー効果が *S. cerevisiae* の代謝に与えた影響についてはその詳細は明らかになっていない。しかしながら、商業生産においてクラブトリー効果を回避することは糖あたりの菌体収率や目的物質の収率の向上につながる

ので、*S. cerevisiae* を物質生産のプラットフォームとして利用するためには重要な取り組みである。*S. cerevisiae* は細胞外にあるグルコースを取り込み、解糖系で変換されたピルビン酸を脱炭酸、還元することでエタノールを生成する。従って先行研究では、グルコースからエタノールへの変換に直接影響を及ぼすグルコースの取り込みやエタノールの生産に関連する遺伝子に着目し、遺伝子組換えによる代謝改変を実施し、*S. cerevisiae* の好気培養中のエタノールの低減を目指した研究が進められてきた（表 1.1.）。

表 1.1. *S. cerevisiae* におけるエタノール低減の先行研究

Strain	Genotype	μ_{\max}	$Y_{e/g}^1$	$Y_{b/g}^2$	ref.
CEN.PK113-7D	Control	0.37	0.28	0.11	26
	mig1 Δ	0.37	0.24	0.10	
	grr1 Δ	0.22	0.22	0.14	
	hxt2 Δ	0.22	0.16	0.14	
CEN.PK113-7D	Control	0.36	0.35	0.12	30
	gdh1 Δ , GDH2	0.35	0.33	0.10	
	gdh1 Δ , GLT1, GLN1	0.34	0.34	0.09	
CEN.PK2	Control	0.44	0.41	0.12	31
	GPD1	0.44	0.32	0.10	
	GPD1, ALD3	0.39	0.33	0.10	
	adh1 Δ	0.26	0.29	0.11	
CEN.PK113-5D	Control	0.33	0.31	0.11	32
	NOX	0.29	0.26	0.10	
	AOX	0.34	0.08	0.09	
W303-1A(a)	Control	0.44	0.38	0.15	40
	adh2 Δ , adh3 Δ , adh4 Δ , adh5 Δ	0.45	0.37	0.14	
	adh1 Δ , adh3 Δ , adh4 Δ , adh5 Δ	0.21	0.13	0.06	
	adh1 Δ , adh2 Δ , adh4 Δ , adh5 Δ	0.19	0.11	0.07	
	adh1 Δ , adh2 Δ , adh3 Δ , adh5 Δ	0.18	0.06	0.05	
	adh1 Δ , adh2 Δ , adh3 Δ , adh4 Δ	0.17	0.06	0.05	

1: 対糖菌体収率 (g-dry biomass/g-glucose)

2: 対糖エタノール収率 (g-ethanol/g-glucose)

MIG1, GRR1: カタボライト抑制に関連する転写因子, HXT2: ヘキソーストランスポーター,

GDH1, GDH2: グルタミン酸デヒドロゲナーゼ, GLT1: NAD⁺依存型グルタミン酸シンターゼ,
GLN1: グルタミンシンターゼ, NAD⁺依存型グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ, ALD3: アルデヒドデヒドロゲナーゼ, ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5: アルコールデヒドロゲナーゼ,
NOX, AOX: NADH オキシダーゼ

遺伝子記号にて大文字は過剰発現、小文字Δは遺伝子欠損を示す。

1. 4. 1. グルコース取り込みに関連する遺伝子

S. cerevisiae は高いグルコースの比消費速度に応じて、解糖系での NADH が過剰に生成し、NAD⁺/NADH の比率が崩れるため、この不均衡を酸素を最終電子受容体として用いるエネルギーマネジメントではなく、その代わりにアルコールデヒドロゲナーゼによって NADH を再酸化し、酵母内の酸化還元状態を正常な状態に保つ役割を果たす。先行研究において、グルコースの比消費速度に比例してエタノールの比生産速度が向上することも上記の記述を支持している (24)。一方で、グルコースの比消費速度を低減すれば、比増殖速度が低下するが、酸素消費速度が向上することが報告されている (25)。従って、グルコースの取り込みを制限することにより、酸素を最終電子受容体として用いることで NADH を再酸化することができるので、結果としてエタノール生産の低減に期待できる。

Raghevendran らはグルコースレプレッションに着目して、エタノール生産の低減に取り組んだ (26)。グルコースレプレッションはグルコース感知や抑制に関する様々な経路が複雑に関係している (27)。そのうち、ヘキソーストランスポーターの一つである HXT2 (28)、または HXT1 の発現を調整している GRR1 (29) を欠損させた場合、エタノール生産がそれぞれ 42.9%、21.5%低減した。また、先行文献で示されていた通り、グルコースの比消費速度の低下に伴い、比増殖速度が低下した (25)。その結果、酸素消費速度が上昇するため、酸化的リン酸化が促進されたので、対糖菌体収率が向上した。

1. 4. 2. NAD⁺/NADH の比率を変化させる遺伝子

エタノール生産が果たす主な役割は解糖系で生成された NADH の再酸化である。従ってエタノールの生産を低減するために、エタノール生合成経路に代わって、酵母内で NADH の再酸化の役割を担う経路が注目された。Moreira らはアンモニア同化経路に着目し、NADPH 消費型のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH1) を NADH 消費型のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH2) に置換することで、NADPH の代わりに解糖系で過剰に生成する NADH を消費し、約 5.7%のエタノール生産を低減させた (30)。また、Cordier らはグリセロール生成経路に着目した。グリセロールはエタノールの副生成物であり、エタノールと同様に細胞質の NADH を再酸化することによって生成する。彼らはグリセロール生成経路の NAD⁺依存型グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPD1) を過剰発現することによって、エタノールの生産を 22.0%低減させた (31)。この試みでは比増殖速度が低下しておらず、エタノール生産に伴って酸化すべき NADH がグリセロール生産によって代替され、NAD⁺/NADH の均衡が正常に保たれたものと考えられる。しかしながら、取り込んだ炭素源をエタノールではなくグリセロールに変換したことになり、結果として対糖菌体収率の向上にはつながらなかった。別のアプローチとして Vemuri らは細胞質、ミトコンドリアの NADH を直接酸化する NADH オキシダーゼをそれぞれ過剰発現させることによって、エタノールを 16.7%、74.2%低減させた (32)。前者ではグリセロールの生産も低下したことから直接的に細胞質の NAD⁺/NADH の不均衡が解決されたことに起因している。後者では NADH オキシダーゼがミトコンドリアにて NADH が酸化されることによって生成した電子が電子伝達系に送られることから、酸化的リン酸化が活発に行われたので、当該酵素を過剰発現させた際には TCA サイクルに関連する酵素の遺伝子発現が向上していた。

1. 4. 3. エタノール合成に関連する遺伝子

ピルビン酸はピルビン酸デカルボキシラーゼとアルコールデヒドロゲナーゼによってエタノールに変換される (9)。従って、先行研究においてこれらの酵素を欠損させ、エタノールを低減させる試みが検討されてきた。ピルビン酸デカルボキシラーゼをコードしている構成遺伝子の PDC1、PDC5、PDC6 を欠損させた株はグルコースを単一炭素源とした好気培養では増殖は確認することはできず、細胞質中のアセチル CoA を合成するために C2 化合物（酢酸やエタノール）を別に添加する必要があった (33)。この結果はピルビン酸デカルボキシラーゼがエタノールの生合成に加えて細胞質のアセチル CoA の生合成においても重要な役割を担っていることを示している。この PDC 欠損株に対して、実験室進化によって C2 化合物非依存型かつグルコース耐性を付与させることによって、増殖速度を回復することに成功した (34)。更にはこの株をゲノム解析することによって、グルコース感知に関わる転写制御因子である MTH1 が部分的に欠損していることが明らかになった。MTH1 の部分欠損はヘキソーストランスポーターの一つである HXT1 の発現を低減させるので (35)、結果として生じるグルコースの消費速度の低下は、比増殖速度を低下させ、酸素消費速度を高めるため (25)、酸素を最終電子受容体として NADH を再酸化することができる。従って、PDC 欠損株に対して同領域を欠損させることによって、グルコースを単一炭素源とした好気培養が可能になった (36)。これらの株はエタノール生産能を欠損させたまま、増殖をすることが可能となり、野生株に比べて高い対糖菌体収率を示したが、副生成物に大量のピルビン酸を蓄積したので、更に高い対糖菌体収率を目指すためには新たにピルビン酸蓄積を低減させることが必要であった。また、別のアプローチとして、ピルビン酸デカルボキシラーゼを欠損させた *S. cerevisiae* に対して外来遺伝子（ピルビン酸オキシダーゼ：ピルビン酸 + リン酸 + 酸素 = アセチルリン酸 + 過酸化水素 + 二酸化炭素、ホスホトランスアセチラーゼ：アセチルリン酸 + CoA = アセチル CoA + リン酸）を導入し、細胞質のアセチル CoA を補完することによって、増殖速度の回復に成功した。更には副生成物の酢酸を低減した後、実験室進化のリバースエンジ

ニアリングによって RNA ポリメラーゼ II のメディエーター複合体のサブユニット (MED2) や NADH 依存型のグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼに点変異を加えることで、野生株に対して比増殖速度が約 60%回復し、高い対糖菌体収率を実現した (37)。

アルコールデヒドロゲナーゼはアセトアルデヒドのエタノールへの還元反応に際して NADH を NAD^+ に再酸化する。この酵素をコードしている遺伝子は 5 つ (ADH1、ADH2、ADH3、ADH4、ADH5) 存在する。ADH1 と ADH2 は細胞質に局在する酵素であるが、役割は異なり、ADH1 はアセトアルデヒドを、ADH2 はエタノールを主に基質として利用する (38)。ADH3 はミトコンドリアに局在する酵素で、*S. cerevisiae* においてミトコンドリアの酸化還元バランスを調整する重要な役割を果たす (39)。ADH4 と ADH5 の詳細な役割は明らかになっていない。これらのアイソザイムのうち、細胞質で主としてエタノールに変換する役割を担う ADH1 を欠損させると、エタノール生産が 29.3%低減し (31)、ADH1、ADH2、ADH3、ADH4 を欠損させた時はエタノール生産を約 84.3%低減した (40)。しかしながら、これらの欠損株は比増殖速度、対糖菌体収率が低下した。主たる原因としてはエタノール生産能を部分的に欠損させたことによって、細胞質での NAD^+/NADH の不均衡が生じたものと考えられ、これらの欠損株ではこの不均衡を解消するために、グリセロールの対糖収率が大幅に向上した。

これまでの先行研究ではエタノール生産に関与している遺伝子を直接欠損させて、エタノール生産を低減させるアプローチを取っているが、これらの報告の多くは比増殖速度や菌体収率の低下も同時に引き起こすものであった。これらの結果から、エタノール生産は *S. cerevisiae* の生命活動を行うために必要な現象であると考えられる。また、細胞内の NADH を直接酸化させる手法はエタノール生産を低減させるために最も効果的な手法であったが、 NAD^+ や NADH が関与している代謝はエタノール合成以外にも多く存在するため、このアプローチは代謝に甚大な影響を与えてしまい

最終的な菌体収率向上に結び付けるのは困難であった。

1. 5. 培養方法

ラボスケールでの検討においてそのスループットの高さゆえにフラスコ培養や試験管培養が検討されることが多い。しかし、商業生産を目指すにあたって、ジャーファーマンターなどの発酵槽による検討は欠かすことができない。発酵槽を用いた培養方法は栄養源の添加方法や培養液の排出方法によって回分培養、流加培養、連続培養の大きく 3 つに分けることができる。これらの培養の違いを表 1. 2. にまとめた。回分培養は植菌し、培養を開始すれば培地の流入と培養液の流出を一切行わない培養方法であり、フラスコ培養や試験管培養と最も似たシステムとなっている。しかしながら、微生物は増殖中に有機酸を排出したり、アンモニアを取り込んだりするため、pH は低下する。そのため、フラスコ培養など pH を調整しない場合は培養途中で培養液の pH が低下し、培養液の pH がその微生物の増殖に適切な範囲から外れてしまい、増殖に障害がかかることが見られる。この問題を回避するために試験管培養やフラスコ培養では pH の緩衝作用が強い天然培地がよく用いられる。また、酸素はその溶解度の低さゆえに、培養においてその供給方法が問題となる。フラスコ培養では振とう培養や旋回培養が用いられるが、その酸素供給速度は十分ではなく、増殖する微生物が消費する酸素に供給する酸素が追い付かなく、培養途中で好気培養から嫌気培養になってしまうことがある。一方で発酵槽を用いると、温度、通気量、攪拌速度、pH などといった微生物の培養に必要な条件を一定に保つことができるので、目的に応じた条件での培養が可能となる。このような性質を持つ回分培養は培養条件を揃えることによって、その微生物が持つ特性を最もよく反映する。しかし、商業生産に回分培養が採用されることはほとんどない。その理由に糖源などの基質を過剰に加えると浸透圧の問題によって増殖が障害されることやクラブトリー効果によるエタノール生産のように副生成物が生成することなどの問題があるからである。これらの問題を解決

できる培養方法には流加培養や連続培養がある。流加培養は培養液の流出は行わないが、培養途中に新しい培地を供給する培養方法である。これにより基質濃度を低濃度で保つことができるため、回分培養のように浸透圧による悪影響に伴う増殖に阻害がかからず、副生成物の生成も最小限に抑えることができるため、高収率で菌体や目的物質の生産が可能となる。また、培地の流入と培養液の流出を同時に連続的に行う連続培養も商業生産で利用されている。連続培養は微生物の置かれる周辺環境が培養時間によって変化する回分培養や流加培養と異なり、培地の流入速度と培養液の流出速度を一定に制御することによって、微生物の置かれる周辺環境が変化せず、微生物が一定の濃度、一定の増殖速度で増殖する定常状態を保つことができる。この培養方法も培養液中の基質濃度を低濃度に保つことができるので、副生成物を低減することができる。また、培地の流入量に生産量が依存し、連続的に発酵生産できる点から、回分培養や流加培養に比べて、日産量が高い培養方法と言われる。連続培養は理論的には恒久的に培養・物質生産が可能な方法と言えるが、設備の複雑さゆえに汚染を完全に防ぐことは難しいことや微生物の遺伝子に重大な変異が発生し有用物質生産能が低いが増殖速度が高いような変異株が生じた場合、本来の生産株がウォッシュアウトしてしまい、生産性が低下し、目的とする日産量を得られないことがあるので、実際の連続培養では経験的に培養日数を決めて培養を行うことが多い。

しかしながら、*S. cerevisiae* を用いて、好気条件下で培養を行う際にはクラブトリ一効果がいずれの培養方法でも問題となる。回分培養では培地中にグルコース濃度が十分存在するので、取り込んだグルコースの多くはエタノールに変換されるために、菌体や目的生産物の収率が低下する。一方で、流加培養や連続培養では培地の供給速度で菌体の比増殖速度を調整できる (図 1. 3.)。比増殖速度を 0.25 h^{-1} 以下で制御すると、*S. cerevisiae* はクラブトリ一効果を示さないので、呼吸 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$) によってエネルギーを獲得する。従って、酸素比消費速度 Q_{O_2} と二酸化炭素の比生産速度 Q_{CO_2} がほぼ同じ値を示すため、呼吸商 ($\text{RQ} = Q_{\text{CO}_2}/Q_{\text{O}_2}$) は 1 に近い

値を示す。一方で、比増殖速度を 0.25 h^{-1} 以上で制御を行うと、*S. cerevisiae* はクラブトリー効果を示すため、呼吸に加えてエタノール発酵 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2\text{CO}_2 + 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) によりエネルギーを獲得する。結果として、比増殖速度が低い場合と比較すると、菌体濃度が低下し、 Q_{CO_2} が増加し、 Q_{O_2} が低下するため、 RQ は増加する。従って、*S. cerevisiae* を高収率で培養を試みる場合、クラブトリー効果を示さないが、高い比増殖速度で流加培養を行うことが望ましい。上記の条件を満たした比増殖速度を設定するために、商業生産では排気ガス中のエタノール濃度で制御するアルコール制御や排気ガスの酸素濃度と二酸化炭素濃度から RQ を算出して制御する RQ 制御が行われている。

しかしながら、この培養方法ではグルコースの供給量が制限されるため、日産量が低下してしまい、商業生産では望ましい解決方法とは言えない。

表 1. 2. フラスコ培養とジャーファーマンターを使用したそれぞれの培養方法の比較

	フラスコ	ジャーファーマンター		
		回分培養	流加培養	連続培養
温度制御	可能	可能	可能	可能
pH 制御	不可能	可能	可能	可能
酸素供給 (攪拌、通気、内圧など)	不十分	十分	十分	十分
培地の流入・流出	なし	なし	流入のみ	流入と流出 流入=流出
培地液量	一定	一定	増加	一定
培養環境	変化する	変化する	変化する	一定
基質濃度の制御	不可能	不可能	可能	可能
増殖速度の制御	不可能	不可能	可能	可能
菌体濃度	最も低い	低い	高い	供給培地に 依存
生産物濃度	低い	低い	高い	供給培地に 依存
培養難易度 (操作煩雑さ、汚染リスク、菌株の安定)	最も低い	低い	高い	最も高い
用途	スクリーニング	フラスコ培養の生産性確認	生産試験	生産試験
クラブトリー効果の回避	不可	不可	グルコース供給量を制限によりある程度可能	グルコース供給量を制限によりある程度可能

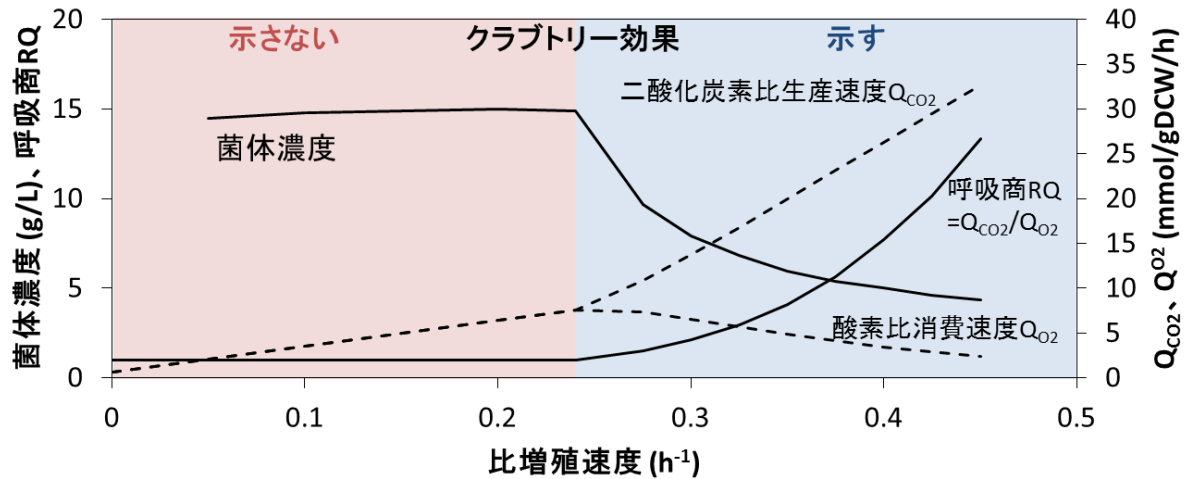


図 1. 3. *S. cerevisiae* のグルコースを制限基質とした連続培養における比増殖速度と菌体濃度、呼吸商との関係 (41)

1. 6. メタボロミクス

生物は DNA を転写し、生成した mRNA を翻訳することでタンパク質を生成する。そのタンパク質が細胞内で酵素反応を始め、様々な化学反応を触媒することで代謝物に変換される。代謝物は細胞内でのゲノム情報の最終産物であることから、その代謝物量は生物が示す表現型と密接に関連していると言える (42)。それ故、これらの代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスは、精密表現型解析に用いられる (43)。また、代謝物が細胞内で担う機能は生物において共通しているものが多いことに加え、他のオミクスのように生物固有の遺伝子情報が必要としないことから、遺伝子情報が明らかになっていない生物にも適用可能な点もメタボロミクスの強みと言える。しかしながら、メタボロミクスは極性や熱安定性、分子量が異なる様々な代謝物を一斉に分析する必要があるため、分析機器の選択も研究を進めるうえで重要となる。メタボロミクスに主として用いられている分析機器にはガスクロマトグラフィ質量分析計 (Gas chromatography/mass spectrometry: GC-MS)、液体クロマトグラフィー質量分析計 (Liquid chromatography/mass spectrometry: LC-MS)、キャピラリー電気泳動質量分析計 (Capillary electrophoresis/mass spectrometry: CE-MS) などがある。これら

の分析機器はそれぞれ異なる特徴を示す。GC-MS は低分子有機酸や芳香族化合物のような揮発性代謝物に加えて、糖やアミノ酸が分析対象となっており、分離能や再現性が高いことから、メタボロミクスに最も広く使われている分析機器となっている。しかし、対象となる化合物を気化させる必要があるため、揮発性かつ熱安定性の高い化合物が分析対象となり、難揮発性の代謝物の直接分析はできず、誘導体化が必須となる。LC-MS はカラムや移動相の選択により、誘導体化せずに核酸やリン酸化合物、有機酸など幅広い化合物の分析が可能となるが、一斉分析のための分離能や再現性が不十分などの問題がある。CE-MS は代謝物のほとんどがイオン性を有していることから、代謝を理解する上で有効な分析法である。しかし、試料の pH やキャピラリーの温度の影響を受けやすく再現性が低いことや試料のイオン強度を高くできないので、検出感度が劣るなどの問題がある。従って、目的に応じて分析機器を選択、または組み合わせる必要があり、その結果として代謝物の網羅性並びに精度を高めることができる。

1. 7. 本論文の目的と構成

メタボローム解析によって細胞内代謝物量の情報を得ることができるため、これまで明らかにされていなかったクラブトリー効果が酵母の代謝へ与えた影響を理解することにつながる。また、同様にメタボローム解析によって同定されたクラブトリー効果によって細胞内の代謝物量が変動した代謝物はクラブトリー効果の影響を受けていると考えられ、その代謝物の培地への添加はクラブトリー効果を低減することが期待できる。本論文では上記の取り組みを実施するに当たり、メタボローム解析を図 1. 4. で示した通り、活用する。表現型の異なる酵母を適切な培養方法で培養し、適切な増殖期にてサンプリングする。サンプリングした菌体から代謝物を抽出し、目的に合った分析機器を選択し、分析を行う。細胞内の代謝物量情報を用いて主成分分析などの多変量解析を実施する。こうして得られた情報と培養結果を照らし合わせるこ

とによって、それぞれの表現型で生じている代謝レベルでの生物学的現象を理解することを目指す。更にはこれらの情報を次の培養条件の検討へフィードバックすることによって、半合理的 (semi-rational) に培養の改善を行うことを目指す。具体的には、以下の構成とする。

第2章ではクラブトリ効果が生じる酵母に与える影響を調べるために、酵母が示す表現型を最もよく反映する回分培養を実施した。クラブトリ陽性酵母である *S. cerevisiae* と陰性酵母である *Candida utilis* において、それぞれ異なる増殖期の菌体から取り出した代謝物量情報と培養結果を組み合わせることで、クラブトリ効果が酵母の代謝へ与える影響を考察した。第3章では *S. cerevisiae* の呼吸発酵代謝を行う希釈率（クラブトリ効果を示す条件）での連続培養においてメタボロミクスによって同定した代謝物を添加することによって、エタノールを低減することを試みた。*S. cerevisiae* の連続培養では一定の希釈率（限界希釈率）を超えるとクラブトリ効果を示し、呼吸代謝から呼吸発酵代謝へと変わる。希釈率の異なる連続培養の菌体からメタボローム解析を実施し、希釈率に応じて量が一律に増減する代謝物を培地に添加する候補とした。加えて、第2章でクラブトリ効果が代謝に与えた影響を反映させ、クラブトリ効果の低減に期待できる代謝物を候補として選抜した。こうして選抜した候補代謝物を呼吸発酵代謝を行う希釈率の連続培養に添加し、エタノール濃度や対糖菌体収率を調べ、クラブトリ効果を低減できるか検討した。最後に第4章では全体を総括し、今後の展望について示した。

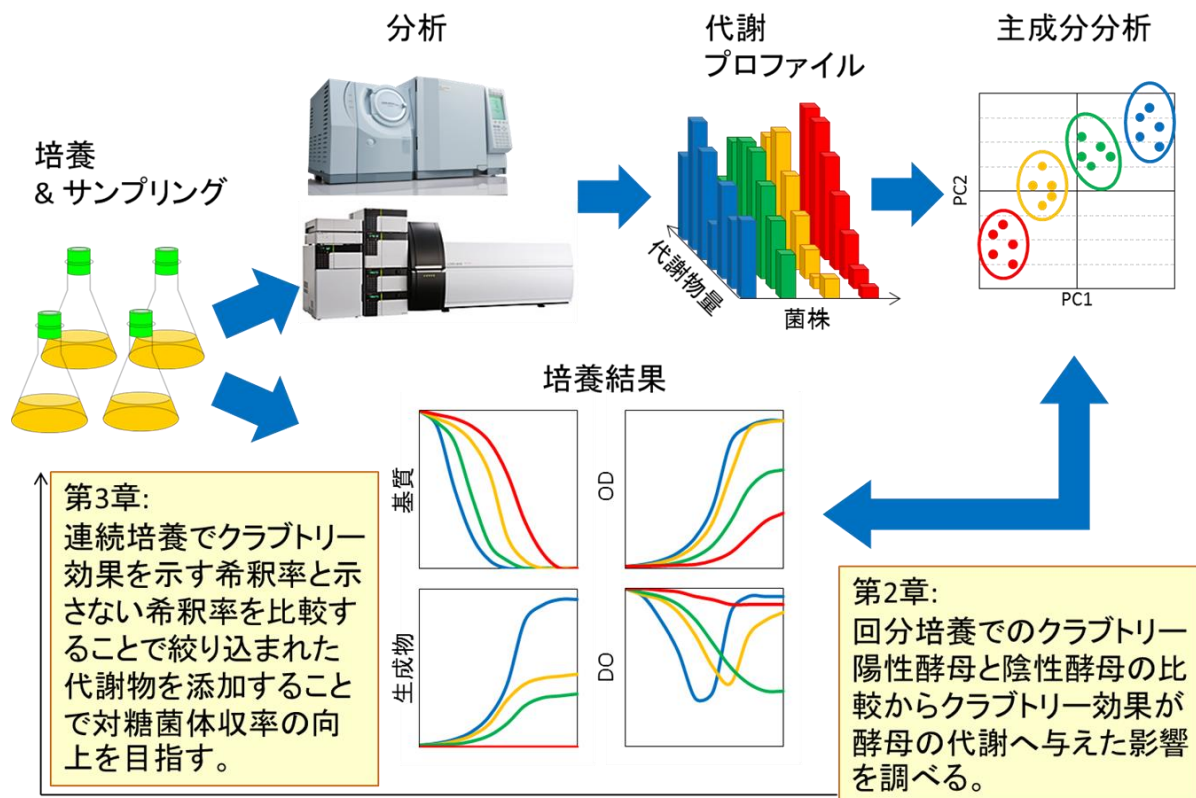


図 1. 4. メタボローム解析による本研究のワークフロー

第 2 章クラブトリー陽性および陰性の差異に基づく酵母代謝プロファイルの比較

2. 1. 諸言

回分培養は目的に応じて、温度、通気量、攪拌速度、pH などの外部要因を制御することができるため、微生物の特性を最も反映した培養方法と言え、同一培養条件下で比較することでその微生物の特性を理解することができる。*S. cerevisiae* は好気条件の回分培養において、ある一定濃度以上のグルコースが存在すると、クラブトリー効果を示し、酸素消費が抑制される (7)。しかしながら、この効果が与える代謝レベルでの影響については明らかになっておらず、クラブトリー効果が誘導するエタノールの低減に関する取り組みは副次的に対糖菌体収率や比増殖速度の低下を伴う。一方で、クラブトリー陰性酵母として知られている *C. utilis* は、好気条件下の培養においてエタノールなどの副生成物を生成せず、高い対糖菌体収率を示す (44)。加えて *C. utilis* は *S. cerevisiae* と同様に食品業界において長く安全な歴史を持っていることから、アメリカ食品医薬品局から食品添加物に与えられる安全基準合格証である GRAS (Generally Recognized As Safe) として分類されてきた (45)。そのため、*C. utilis* は大規模培養技術が発展しているため、グルタチオンや酵母エキスの商業生産菌株として利用されている。しかしながら、ゲノム配列は明らかになっているが (46)、倍数性が高く、遺伝子組換えが十分に発展していないことから *C. utilis* を対象とした研究は進んでいない (47, 48, 49)。

本章では、クラブトリー陽性酵母である *S. cerevisiae* と陰性酵母である *C. utilis* の好気条件下での回分培養中の各増殖期におけるメタボローム解析を実施した。続いて、回分培養の結果から得られた比速度から算出した対数増殖後期の NADH の比消費速度と比生産速度を算出した。両酵母のこれらの結果を比較することで、*S. cerevisiae* の代謝がクラブトリー効果によって受ける影響を考察した。

2. 2. 実験方法

2. 2. 1. 菌株および培養

S. cerevisiae NBRC101557 および *C. utilis* NBRC0988 は Biological Resource Center, NITE (NBRC) より取得した。前培養は 100 mL の YPD 培地 (10g/L Dried yeast extract, 20 g/L HIPOLYPEPTON, 20g/L D-Glucose) を含んだ 500 mL の三角フラスコ (HARIO Co., Ltd., Tokyo, Japan) で 30℃、180 rpm (BF-43FL MR, TAITEC CORPORATION, Saitama, Japan) にて 18 時間行った。本培養は初期 OD600 が 0.1 になるように前培養液をそのまま植菌し、回分培養を開始した。培養液の培地組成は 10 g/L glucose、1.5 g/L KH_2PO_4 、0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.06 g/L CaCl_2 、5.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.4 g/L K_2SO_4 、0.1 mg/L Biotin、1.5 mg/L D-pantothenic acid hemicalcium salt、60 mg/L myo-inositol、3.0 mg/L Pyridoxine Hydrochloride、14 mg/L Thiamine Hydrochloride、0.2 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、4.0 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、30 mg/L BIOSPUMEX 36K (4 M の NaOH にて pH5.0 に調整した) である。解糖系とペントースリン酸経路のフラックスを決定する検討の際には糖源に D-glucose-1- ^{13}C を使用した。これら全ては FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)、Sigma (St. Louis, Missouri, USA) にて購入した。メタボローム解析では 10 L の Jar-fermentar (Mitsuwa Frontech Corporation, Osaka, Japan) に対して 5 L の培地を用い、温度: 30℃で、攪拌数: 700 rpm、通気: 1 L/min で行い、4 M NaOH にて pH を 5.0 に制御した。解糖系とペントースリン酸経路のフラックスを決定する検討の際には、Bio Jr. 8 (ABLE corporation, Tokyo, Japan) に張り込んだ 100 mL の培地を用い、温度: 30℃、攪拌数: 1000 rpm、通気: 1 vvm で行い、1 M NaOH にて pH を 5.0 に制御した。

2. 2. 2. 乾燥菌体重量、有機酸、グルコース、溶存酸素濃度の測定

回分培養初期の乾燥菌体重量 (cell dry weight; CDW) を直接測定することは困難

であることから、ダブルビーム分光光度計 U2900 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) を用いて菌体増殖に伴う濁度は OD₆₀₀ を測定した。その後、対数増殖期の OD₆₀₀ と乾燥菌体重量の関係から OD₆₀₀=1.0 を 0.27 gCDW/L (*S. cerevisiae*) と 0.29 gCDW/L (*C. utilis*) として菌体濃度を計算した。培地中の有機酸やグルコース濃度の測定には培養液を遠心分離した上清を用いた。酢酸、クエン酸、コハク酸の測定には Organic Acid Analysis System (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) を使用した。また、グリセロール、エタノール濃度の測定には BF-7 (Oji Scientific Instruments Co., Ltd., Hyogo, Japan) を使用した。グルコース濃度の測定にはグルコース CII-テストワコー (FUJIFILM Wako) を使用した。溶存酸素 (dissolved oxygen; DO) 濃度の測定には光学式溶存酸素センサ InPro6860 (Mettler-Toledo International Inc., Ohio, USA) を使用した。

2. 2. 3. 比速度の算出

菌体、グルコース、有機酸濃度から比速度を次の 3 つの式 (式 1 - 3) によって計算した。

$$dX/dt = \mu X \quad (\text{式 1})$$

$$dP/dt = \rho X \quad (\text{式 2})$$

$$dS/dt = - \nu X \quad (\text{式 3})$$

X 、 P 、 S はそれぞれ菌体、生成物、基質濃度を示した。また、 μ 、 ρ 、 ν はそれぞれ比増殖速度、比生産速度、比消費速度を示した。一定の比速度を示す増殖期においてそれぞれ μ および ρ 、 ν と決定した。

2. 2. 4. メタボローム解析のための菌体の回収と代謝物の抽出

Hashim らの手法に則って行った (50)。培養液の OD₆₀₀ を測定し、sampling volume×OD₆₀₀=80 となるように設定し、直径 47 mm の 0.45 µm のポアサイズのメンブレンフィルター (MilliporeSigma, Burlington, Massachusetts, USA) を用いて吸引濾過を行い、蒸留水にて洗浄した。そのサンプルを凍結乾燥させた後に 5.0 mg を測定し、内部標準 (0.2 mg/ml Ribitol, 0.2 µg/ml (1S)-(+)-10 camphorsulfonic acid) を 90 µl 加えた。1.0 mL の mix solvent (methanol/ H₂O/Chloroform:2.5/1/1 (v/v/v)) を加え、ボルテックス (VORTEX-2 GENIE, Scientific industries, inc, Bohemia, New York, USA) で 20 秒激しく混合した後、Thermomixer Comfort (Eppendorf Co., Ltd., Hamburg, Germany) にて 37°C、1200 rpm で 30 分間処理し、遠心分離 (4°C、3 min、16000 rcf) を行った。上清の 900 µl に対して、450 µl の超純水 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) を加え、ボルテックスで 20 sec 混合した後、遠心分離 (4°C、3 min、16000 rcf) を行った。上清のうち 700 µl を GC-MS 用に、350 µl を LC-MS/MS 用に分け、それぞれ 2 時間の遠心濃縮後、一晚凍結乾燥を行った。

2. 2. 5. GC-MS 分析

凍結乾燥したサンプルに 20 mg/ml の methoxyamine hydrochloride (Sigma) を溶解した pyridine (FUJIFILM Wako) を 100 µl 加え、Thermomixer Comfort にて 1200 rpm、30°C、90 min インキュベートした。その後、50 µl の *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) (GL Sciences Inc., Kyoto, Japan) を加え Thermomixer comfort にて 1200 rpm、37°C、30 min インキュベートした。GC-MS 分析は以前の報告に基づいて行った (51)。本研究では GC-MS 分析に GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu) を使用し、GCMS solution ver. 4.20β (Shimadzu) を用い、データを取得した。カラムには 30 m×0.25 mm i. d. DF :0.25 µm InertCap 5MS/NP (GL sciences) を用いた。気化室温度は 230°C であり、高純度

ヘリウムをキャリアーガスとして使用し、流量は 1.12 mL/min である。カラムの温度は 80°C で 2 分間保持した後、320°C まで 15 °C/min で昇温させ、その温度で 6 分間保持した。インターフェイス温度は 250°C で、イオン源温度は 200°C、EI は 70V、スキャン速度は 10 scan/sec である。測定マス範囲は 85-500 m/z である。GC-MS から取り出したデータは netCDF でエクスポートし、ピーク同定とアライメントは Metalign (Ver. 041012) で行った (52)。化合物の自動同定は AIoutput (ver. 1. 29) にて行った (53)。同定したピークは手動で Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) にて確認した。

2. 2. 6. LC-MS/MS 分析

30 µl の超純水 (Thermo Fisher Scientific) に溶解させた凍結乾燥サンプルを ion pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) にて測定した。本研究では LC-MS/MS 分析に LCMS8030 Plus (Shimadzu) を使用した。カラムには L-column 2ODS (150 nm particle size 3 mm, Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo, Japan) を使用し、移動相 A に 10 mM tributylamine with 15 mM acetate in ultra-pure water を移動相 B には methanol を使用した。移動相 B の割合は最初の 1 分間は 0% で、その後 10%/min で 15% になるまで上昇させ、15% で 3 分間保った。50% まで 7%/min で上昇させ、その後 100% まで 5%/min で上昇させ、100% で 1 分間保ち、0.5 分で 0% まで減少させた。インジェクション量は 1 µL で probe position は +1.5 nm で de-solvent line は 250°C、drying gas flow は 15 L/min、ヒートブロックの温度は 400°C、nebulizer gas flow は 2 L/min であった。代謝物は negative ion mode でイオン化させた。LC-MS/MS から取り出したデータファイルは Abf file converter (Reifycs Inc., Tokyo, Japan) によって abf file に変換し、multi reaction monitoring based probabilistic system for widely targeted metabolomics (MRMPROBS) にて解析した (54)。

2. 2. 7. 多変量解析

主成分分析は Statistical analysis tool を用いて行った (55)。それぞれの代謝物量は LC-MS/MS と GC-MS から得られた強度を内部標準物質の強度に対する相対強度で示した。前処理には Auto scaling method を用い、変換は 1/4 root を使用した。

2. 2. 8. 解糖系とペントースリン酸経路のフラックスの決定

対数増殖期後半の培養液 (*S. cerevisiae*: OD₆₀₀=3.0、*C. utilis*: OD₆₀₀=8.0) を取得し、直径 47 mm の 0.45 μm のポアサイズのメンブレンフィルター (Millipore) を用いて吸引濾過を行い、蒸留水にて洗浄した。菌体タンパク質由来のアラニンを分析するために、そのサンプルを凍結乾燥させた後に 2.0 mg を測定し、2 mL の 6 N HCl (FUJIFILM Wako) を加え、105℃で 18 時間加水分解した。濾過後の 500 μL の反応液に対して 10 μL の内部標準液 (600 μM cycleleucine) を加え、乾固させた。乾固残渣を 50 μL の acetonitrile と 50 μL の

N-(ter-butyldimethylsilyl)-N-methyl-trifluoroacetamide containing 1% tert-butyldimethylchlorosilane に溶解し、95℃で 1 時間反応させた。冷却後、上清を GC-MS 分析のために使用した。

アラニン由来の[M+85]の質量同位体分布は GCMS QP2010 Ultra (Shimadzu) を使用して測定した。カラムには DB-5MStDG; 30 m × 0.25 mm ID × 0.25 mm; (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, USA) を、carrier gas には helium を用いた。flow rate は 1.0 mL/min、detection mode は selected ion monitoring、ion source temperature は 230℃、electron impact ionization は 70 eV、injection volume は 1 μL、split ratio は 1:10 にて行った。oven temperature は 142℃で 4 分間保った後、1℃/min で 155℃に昇温し、300℃まで 10℃/min で昇温した。

続いて、得られたアラニンの質量同位体分布から解糖系とペントースリン酸経路の

分岐比を調べた (56)。解糖系を経由した場合、D-glucose-1- ^{13}C から非標識のアラニンと標識されたアラニンが 1:1 で生じる。一方で、ペントースリン酸経路を経由した場合、D-glucose-1- ^{13}C の ^{13}C ラベルは脱炭酸で失われるため、5/3 mol の非標識のアラニンが生じる (図 2. 1)。従って、解糖系とペントースリン酸経路の分岐比はアラニンの質量同位体分布から次の 2 式 (式 4-5)において算出できる。

$$a : b = x + 5/3y : x \quad (\text{式 4})$$

$$1 = x + y \quad (\text{式 5})$$

a と b はアラニン[M-85]の M0 と M1 の正規化した質量同位体比を示した。x と y は解糖系とペントースリン酸経路のフラックスの分岐比を示した。

解糖系およびペントースリン酸経路のフラックス (mmol/gDCW/h) は次式：グルコースの比消費速度×解糖系またはペントースリン酸経路の分岐比を用いて計算した。

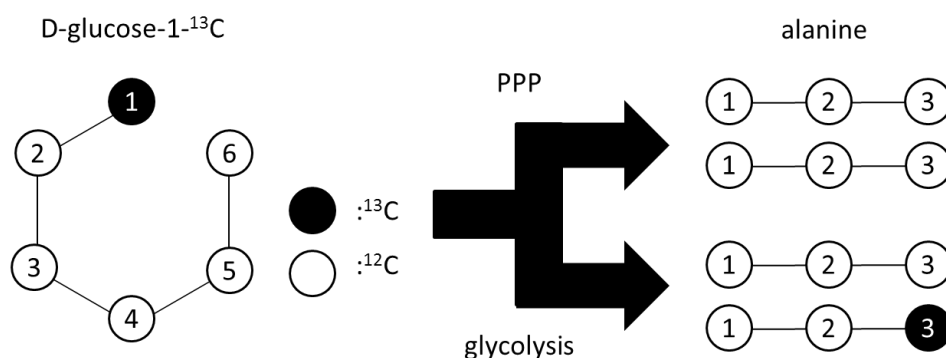


図 2. 1. PPP と解糖系を介した alanine の標識比率

2. 2. 9. NADH の比生産速度の計算

培養結果から得られた炭素当たりの比速度から NADH の比生産速度を算出するため、以下の仮定を行った。グルコースで取り込んだ炭素原子は菌体合成と排出された代謝物 (エタノール、酢酸、グリセロール、クエン酸、酢酸) と CO_2 に変換された。

単位炭素当たりのバイオマスの分子量を 26.4 とした (57)。CO₂ を生成する経路はエタノール生合成経路とペントースリン酸経路、TCA サイクルである。エタノール生合成経路で生成される CO₂ の比生産速度はエタノールの比生産速度から算出した。ペントースリン酸経路で生成される CO₂ の比生産速度はフラックス比より算出したペントースリン酸経路のフラックスから算出した。これらの CO₂ の比生産速度を除いた値が TCA サイクルで生成した CO₂ の比生産速度とした。ペントースリン酸経路では 3 mol の G6P から 5 mol の GAP が生成されるとした。NADH は解糖系と TCA サイクルで生成されているとみなした。解糖系では 1 mol のグルコース辺り 2 mol の NADH が生成され、TCA サイクルでは 3 mol の CO₂ の消費に対して 4mol の NADH が生成されるとした。一方で、1 mol のエタノールやグリセロール生成の際に 1 mol の NADH が消費されるとした。

2. 3. 実験結果

2. 3. 1. 回分培養の結果

クラブトリー効果が培養に与える影響を検証するために、*S. cerevisiae* と *C. utilis* の回分培養を実施した (図 2. 2.)。本章の培養条件において溶存酸素濃度が 4 ppm 以上あることを確認しており、酸素が枯渇していないことから好気条件が十分に保たれていた。増殖に応じて増殖期をそれぞれ区分したが、対数増殖期は糖濃度に応じてそれぞれ、9.5 g/L 以上を対数増殖前期、7.0 から 9.5 g/L を対数増殖中期、7.0 g/L 以下を対数増殖後期とした。それぞれの増殖期で比速度を計算した結果、対数増殖中期と対数増殖後期でのみ全ての比速度が一定となった (表 2. 1)。図 2. 2 および表 2. 1 から *S. cerevisiae* はクラブトリー効果を示すため、*C. utilis* に比べてグルコースを消費した際の菌体濃度は低く、エタノールを生成した。また、比増殖速度は *S. cerevisiae* ($0.400 \pm 0.014 \text{ h}^{-1}$) が *C. utilis* ($0.592 \pm 0.014 \text{ h}^{-1}$) より低い、グルコース比消費速度は *S. cerevisiae* ($14.6 \pm 0.5 \text{ mmol/gDCW/h}$) が *C. utilis* (6.27 ± 0.19)

mmol/gDCW/h)より高い。これはクラブトリー効果の影響により、取り込んだグルコースは炭素源として菌体形成に貢献しているのではなく、エタノールとして排出されていることを意味する。それ故、菌体収率が *S. cerevisiae* (0.183 ± 0.002 gDCW/g) は *C. utilis* (0.574 ± 0.006 gDCW/g) より低くなった。また、菌体外に排出された代謝物において *S. cerevisiae* ではエタノールの副生成物として知られるグリセロール (0.88 ± 0.05 mmol/gDCW/g) だけでなく、酢酸 (0.08 ± 0.01 mmol/gDCW/h) やクエン酸 (0.016 ± 0.000 mmol/gDCW/h) が確認された。一方で、*C. utilis* では *S. cerevisiae* と比較すると、クエン酸 (0.034 ± 0.004 mmol/gDCW/h) やコハク酸 (0.056 ± 0.004 mmol/gDCW/h) をより多く菌体外に排出した。これらは TCA サイクル中で生合成される代謝物であるため、*C. utilis* は取り込んだグルコースが解糖系を経由して、効率的に TCA サイクル中の代謝物に変換されていることが考えられた。

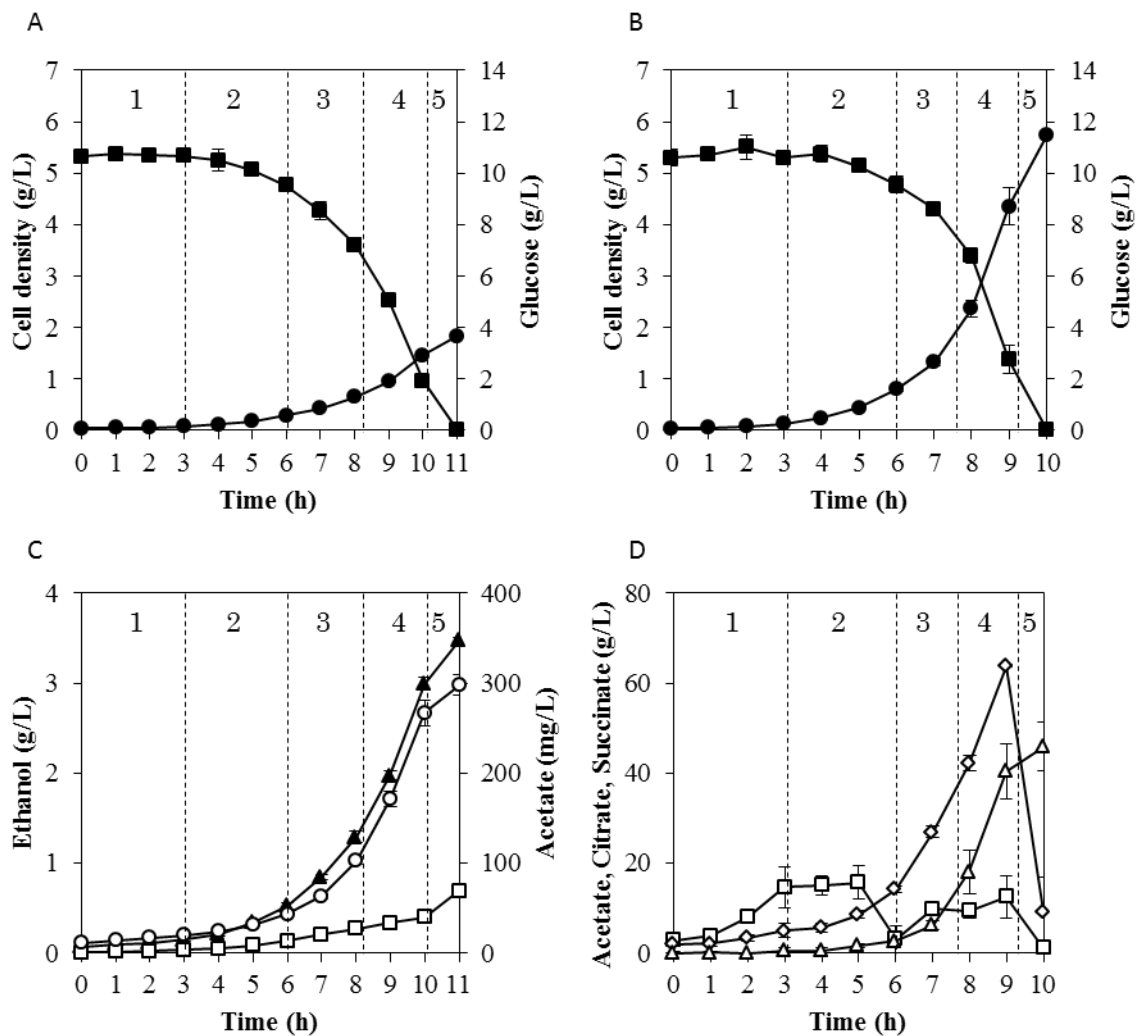


図 2. 2. *S. cerevisiae* (A, C) と *C. utilis* (B, D) の回分培養の結果

菌体濃度 (●)、グルコース濃度 (◆)、エタノール (▲)、グリセロール (○)、酢酸 (□)、クエン酸 (◇)、コハク酸 (△)で示した。1 は誘導期、2 は対数増殖前期、3 は対数増殖中期、4 は対数増殖後期、5 は定常期を示した。全ての結果は反復数 3 で行った結果であり、エラーバーは標準偏差を示す。

表 2. 1. *S. cerevisiae* と *C. utilis* の好気回分培養での対数増殖中期、後期の比速度

		<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. utilis</i>
比増殖速度 (h^{-1})		0.400 ± 0.014	0.592 ± 0.014
	エタノール	18.3 ± 0.2	n. d.
	酢酸	0.08 ± 0.01	n. d.
比生産速度 (mmol/gDCW/h)	グリセロール	0.88 ± 0.05	n. d.
	クエン酸	0.016 ± 0.000	0.034 ± 0.004
	コハク酸	n. d.	0.056 ± 0.004
グルコース比消費速度 (mmol/gDCW/h)		14.6 ± 0.5	6.27 ± 0.19
収率 (gDCW/g-glucose)		0.183 ± 0.002	0.574 ± 0.006

2. 3. 2. *S. cerevisiae* と *C. utilis* のそれぞれの増殖期におけるメタボローム解析

S. cerevisiae は大量のエタノールを培地中に排出する (図 2. 2.)。エタノールはアルコールデヒドロゲナーゼ (58) によって生合成され、この酵素はアセトアルデヒドと NADH からエタノールと NAD^+ に変換するので、*S. cerevisiae* はエタノール生産を通じて大量の NADH を再酸化することになる。NADH は生物の様々な代謝に関連している重要な補酵素であるので (59)、多くの代謝に影響をしていることが考えられる。従って本章では代謝を網羅的に理解する必要があるので、LC-MS/MS と GC-MS を用いたメタボローム解析を実施することによって、クラブトリー効果が代謝に与える影響を理解することを試みた。誘導期、対数増殖前期、対数増殖中期、対数増殖後期、定常期の菌体から代謝物を抽出し、GC-MS と LC-NS/MS によって同定した代謝物の量を比較した (表 2. 2)。GC-MS でのみ同定できた代謝物は 21 個、LC-MS/MS でのみ同定できた代謝物は 63 個、LC-MS/MS および GC-MS で同定できた代謝物は

22 個あった (表 2. 3)。同定できた代謝物は糖や糖リン酸、アミノ酸、有機酸、補酵素が中心であった。今回同定したメタボロームデータを用いた主成分分析の結果において、PC1 に沿って *S. cerevisiae* と *C. utilis* の違いで分離した (図 2. 3A)。*S. cerevisiae* はクラブトリー陽性酵母で、*C. utilis* は陰性酵母であるので、PC1 の分離はクラブトリー効果に起因したものと考えられ、PC1 の分離に貢献した代謝物はクラブトリー効果が酵母に及ぼした影響として考えることができる。PC1 のローディングデータから、1,3-BPG、3-PG/2PG、PEP、6PGA、Ru5P/Xu5P、クエン酸、イソクエン酸、2-OG、フマル酸、コハク酸、リンゴ酸、ATP、AMP、アデニンがそれぞれの酵母の特徴を示しているとみなすことができる (図 2. 3. B、別表 2)。中央代謝マップにおいてこれらは解糖系、ペントースリン酸経路、TCA サイクルに含まれている代謝物やヌクレオチドであった (図 2. 4.)。解糖系の後半に位置する 1, 3-BPG、3PG/2PG、PEP の細胞内の代謝物量は *S. cerevisiae* の方が *C. utilis* より低くなった。続いてペントースリン酸経路の入り口に位置する 6PGA や Ru5P/Xu5P の細胞内代謝物量も同様に *S. cerevisiae* で低くなった。TCA サイクルではクエン酸やイソクエン酸の細胞内代謝物量は *S. cerevisiae* で高くなったが、コハク酸やフマル酸、リンゴ酸では低くなった。ヌクレオチドの細胞内代謝物量において AMP は *S. cerevisiae* で高くなったが、ADP では同等で、ATP では低くなった。

表 2. 2. メタボローム解析で使⽤した *S. cerevisiae* (A) と *C. utilis* (B) の詳細な培養結果

(A)

	OD	glucose (g/L)	ethanol (g/L)	acetate (mg/L)
1	0.24	10.6	0.15	3.59
2	0.79	9.93	0.41	11.5
3	1.91	7.37	1.04	25.1
4	4.02	3.93	2.35	37.2
5	5.98	0.67	3.38	43.9

(B)

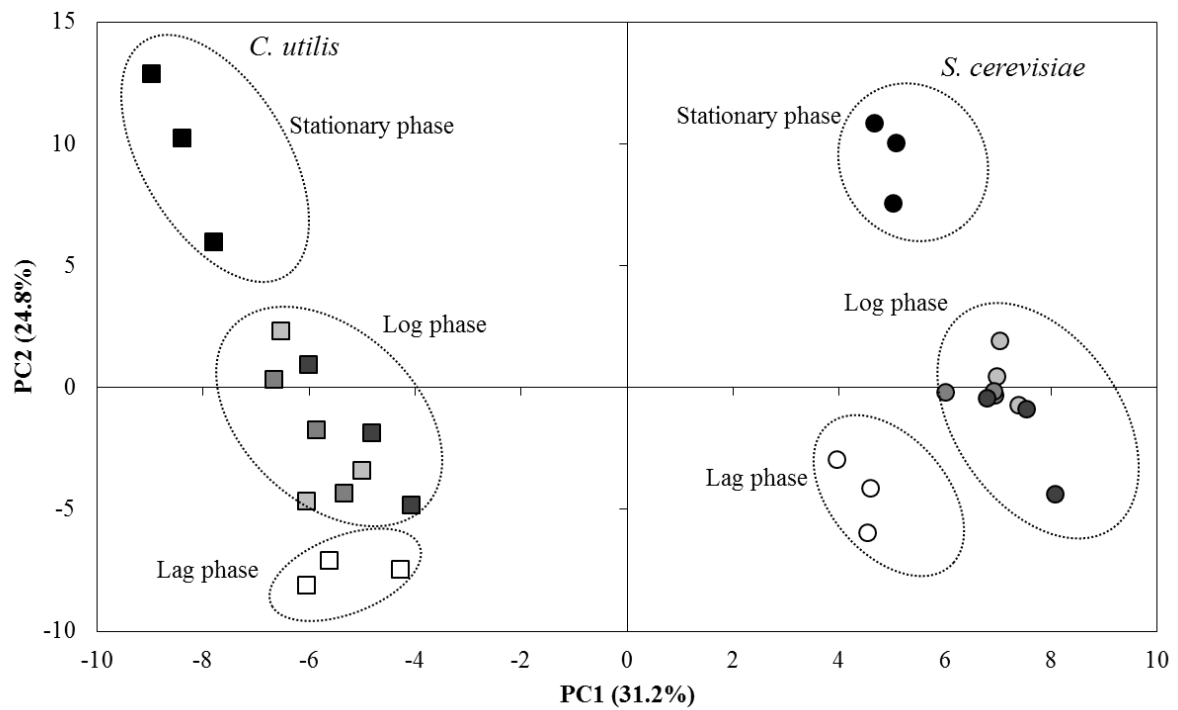
	OD	glucose (g/L)	ethanol (g/L)	acetate (mg/L)
1	0.25	10.9	0.06	5.73
2	0.84	10.6	0.02	17.7
3	5.02	8.4	0.01	10.5
4	12.46	4.4	0.01	14.0
5	18.13	0.8	0.01	18.2

1. 誘導期、2. 対数増殖前期、3. 対数増殖中期、4. 対数増殖後期、5. 定常期

表 2. 3. LC-MS/MS と GC-MS にて同定された代謝物リスト

Instrument	metabolites
LC-MS/MS	2-Isopropylmalate, 2OG, 3PGA, 6PGA, Acetyl-CoA, ADP, a-GP, AMP, Arginine, ATP, b-GP, 1,3-BPG, cAMP, CDP, CMP, CoA, CTP, Cysteine, Cytidine, F1P, F6P, FAD, FBP, FMN, G1P, G6P, GDP, Glutathione, Glyoxylate, GMP, GTP, Guanine, Guanosine, Histidine, HMG-CoA, IMG, IPP and DMAPP, Lactate, Leucine, Malonyl CoA, MEP, NAD ⁺ , NADH, NADP ⁺ , NADPH, Nicotinate, Pantothenate, PEP, PRPP, Pyridoxamine-5P, Pyruvate, R1P, R5P, Ru5P, S7P, Shikimate-3P, TMP, TPP, UDP, UMP, Uridine, UTP, XMP
GC-MS	2-Aminobutyric acid, 2-Hydroxypyridine, Alanine, Arabitol, Citrulline, Glucose, Glycine, Homoserine, Inositol, lauric acid, Lyxose, Malic acid, N-Acetyl-L-Glutamate, n-Propylamine, Ornithine, Oxalate, Phosphate, Putrescene, Pyroglutamic acid, Shikimic acid, Pyruvate+Oxalacetic acid
LC-MS/MS and GC-MS	4-aminobutyrate, Adenine, Adenosine, Asparagine, Aspartate, Citrate, Fumarate, Glutamate, Glutamine, Isocitrate, Isoleucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Proline, Serine, Succinate, Threonine, Trehalose, Tryptophan, Tyrosine, Valine

(A)



(B)

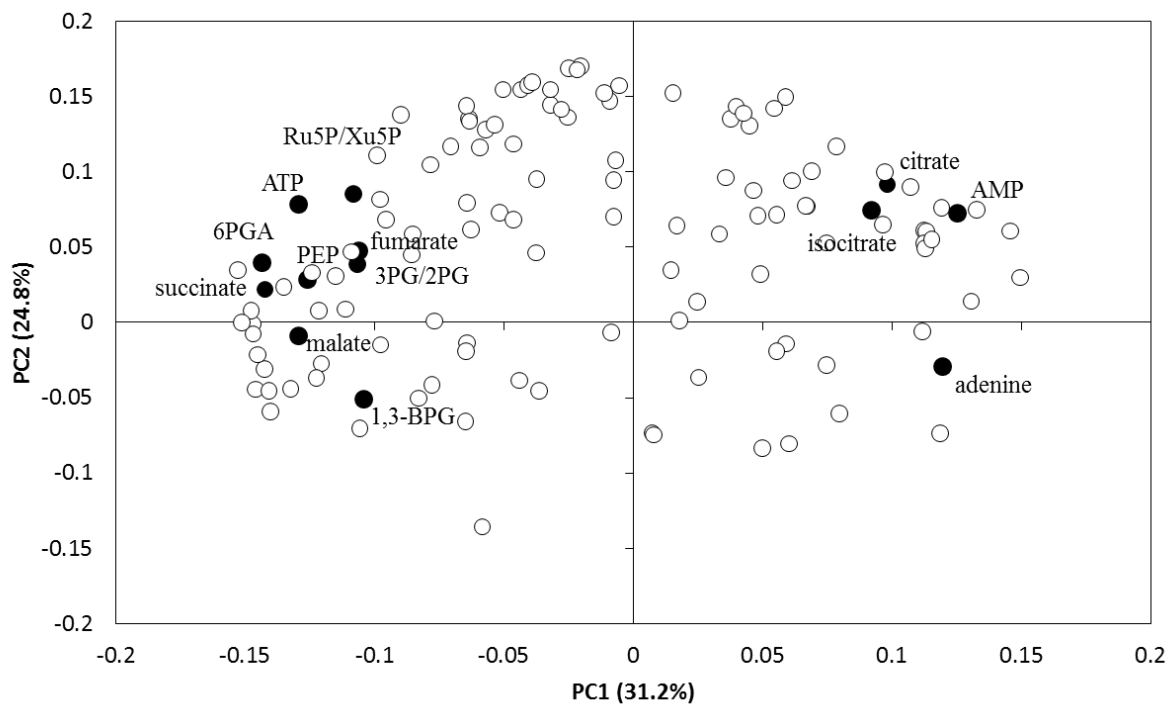


図 2. 3. *S. cerevisiae* と *C. utilis* のメタボロームデータによる主成分分析の結果

(A) スコアプロット (寄与率: PC1=31.2%、PC2=24.8%)、(B) 主成分分析の結果に基づくローデ

ィングデータを示す。Aは *S. cerevisiae* を丸で、*C. utilis* を四角で示し、経時的な結果を誘導期（白）から定常期（黒）をグラデーションにて示した。

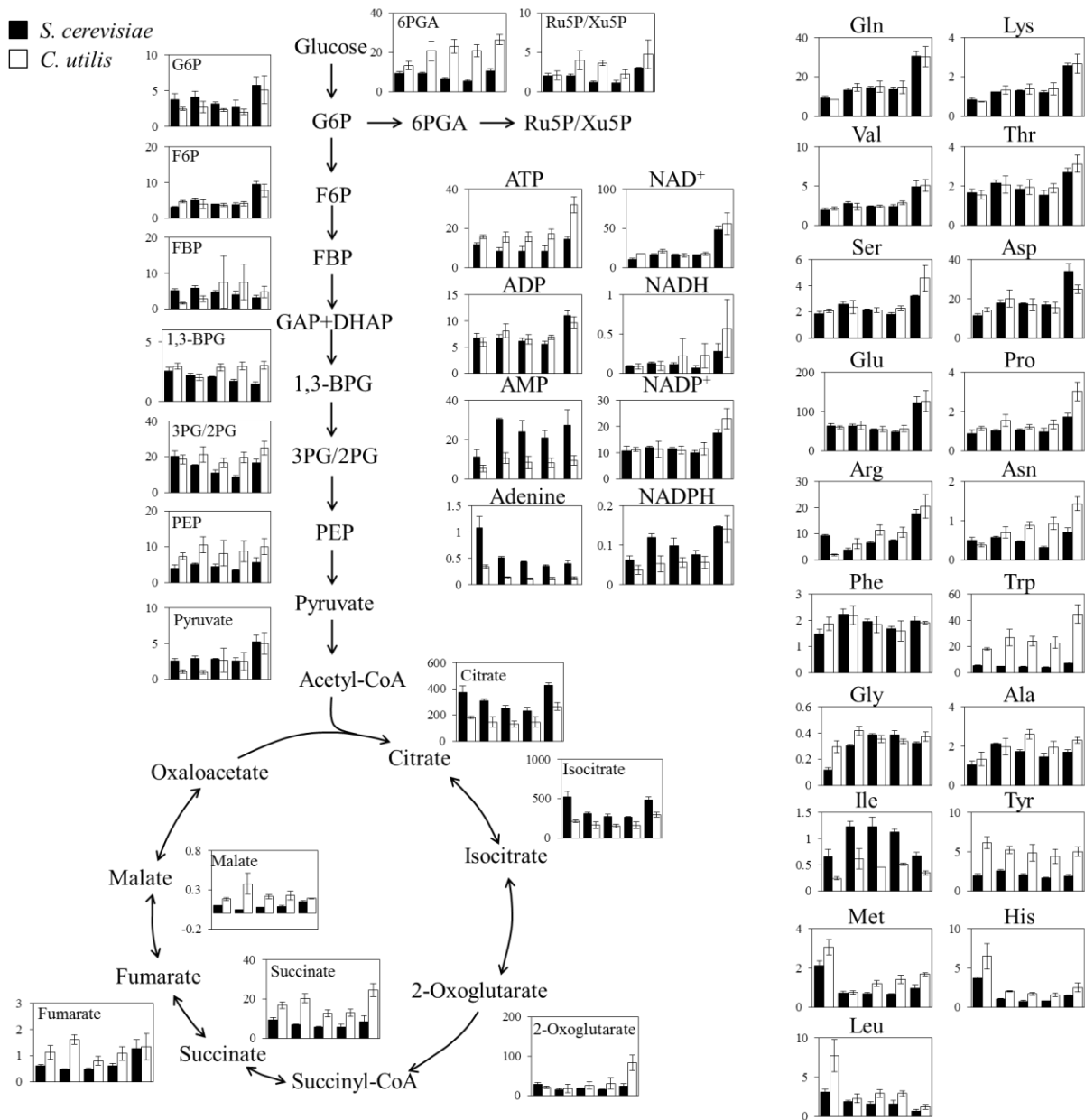


図 2. 4. 代謝マップ

誘導期、対数増殖前期、対数増殖中期、対数増殖後期、定常期を左から右で示した。*S. cerevisiae* は黒棒、*C. utilis* は白棒で示した。縦軸は相対値を示しており、全ての結果は反復数 3 で行った結果であり、エラーバーは標準偏差を示す。

2. 3. 3. 解糖系とペントースリン酸経路の分岐比の測定

菌体中の NADPH の多くはペントースリン酸経路を介して生成されると知られている (15)。従って、解糖系とペントースリン酸経路のフラックスを調べることは、酵母の特徴を理解する上で非常に重要となる。本章では、1 位を ^{13}C で標識したグルコースを単一炭素源として培養した菌体由来のアラニンの標識比率を調べることによって、G6P の分岐比を決定し、解糖系とペントースリン酸経路のフラックスを調べた (表 2. 4.)。この結果より、*S. cerevisiae* ($13.5\pm 2.0\%$) に比べて、*C. utilis* ($48.8\pm 0.9\%$) は取り込んだグルコースに対して高い割合でペントースリン酸経路を使用していることが明らかになった。同様に、*S. cerevisiae* はグルコースの比消費速度が高いにも関わらず、菌体あたりのペントースリン酸経路のフラックスも同様に *S. cerevisiae* ($1.97\pm 0.06 \text{ mmol/gDCW/h}$) は、*C. utilis* ($3.06\pm 0.09 \text{ mmol/gDCW/h}$) に比べて低くなった。

表 2. 4. 対数増殖後期における解糖系とペントースリン酸経路間での G6P の分岐比

	ratio (%)		flux (mmol/gDCW/h)	
	glycolysis	PPP	glycolysis	PPP
<i>S. cerevisiae</i>	86.5 ± 2.0	13.5 ± 2.0	12.6 ± 0.4	1.97 ± 0.06
<i>C. utilis</i>	51.1 ± 0.9	48.8 ± 0.9	3.21 ± 0.10	3.06 ± 0.09

2. 3. 4. NADH の比生産速度と比消費速度

S. cerevisiae は大量のエタノールを生産するため、NADH を再酸化する (図 2. 2)。従って、クラブトリ効果を理解するためには中央代謝で生産、消費される NADH の比速度を比較することは重要である。本章では比増殖速度やグルコースの比消費速度や培地中の生成物の比生産速度から NADH の比生産速度と比消費速度を算出した (図 2. 5)。培養結果より、全ての比速度が一定であった増殖期が対数増殖中期ならば

に対数増殖後期のみであったので（表 2. 1.）、対数増殖後期の NADH の比生産速度と比消費速度を算出した。解糖系や TCA サイクルでの NADH の比生産速度では *S. cerevisiae* (45.0 ± 4.7 mmol/gDCW/h) の方が *C. utilis* (27.1 ± 1.2 mmol/gDCW/h) に比べて高くなった。これはグルコースの比消費速度に依存して *S. cerevisiae* の解糖系を介した NADH の比生産速度 (28.5 ± 0.9 mmol/gDCW/h) が *C. utilis* (11.5 ± 0.4 mmol/gDCW/h) よりも高くなったことに依存しており、TCA サイクルを介した NADH の比生産速度は *S. cerevisiae* (16.5 ± 3.9 mmol/gDCW/h) と *C. utilis* (15.6 ± 0.8 mmol/gDCW/h) で大きな違いは見られなかった。一方で、*S. cerevisiae* ではクラブトリー効果によって生成されるエタノール (18.3 ± 0.2 mmol/gDCW/h) やグリセロール (0.88 ± 0.04 mmol/gDCW/h) の生産に伴い、NADH が再酸化された。そのため、正味の NADH の比生産速度は *S. cerevisiae* (25.8 ± 4.9 mmol/gDCW/h) と *C. utilis* (27.1 ± 1.2 mmol/gDCW/h) で大きな違いは見られなかった。

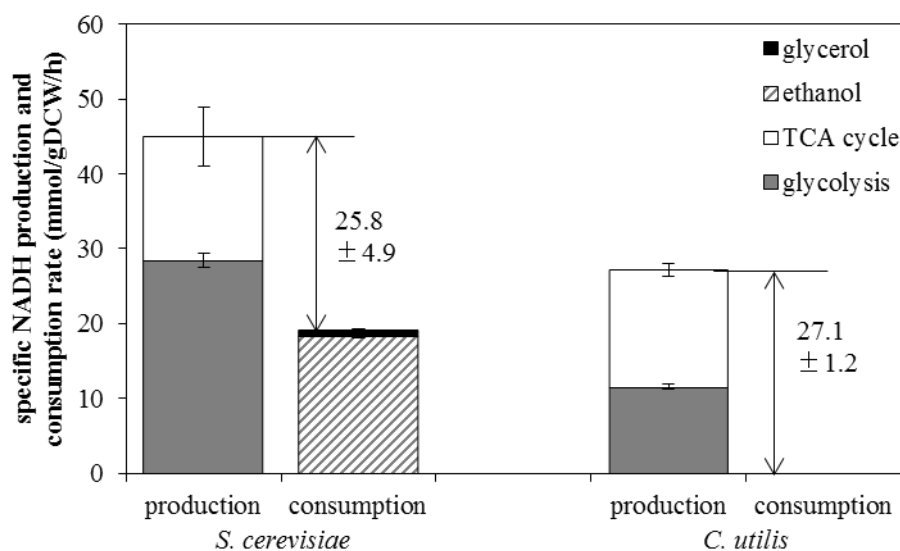


図 2. 5. 対数増殖後期での *S. cerevisiae* と *C. utilis* の NADH の比生産速度ならびに比消費速度

全ての結果は反復数 3 で行った結果であり、エラーバーは標準偏差を表す。

2. 4. 考察

酵母は NADH を細胞質において解糖系をミトコンドリアでは TCA サイクルを介して生成する。しかしながら、*S. cerevisiae* は他の真核生物とは異なり、呼吸鎖複合体 I を有していない (60)。そのため、細胞質では解糖系を介して生成した NADH はミトコンドリアの外膜に局在する NADH デヒドロゲナーゼである NDE1 と NDE2 (61) や細胞質の NADH 依存型グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ並びに膜結合グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼから成るグリセロール-3-リン酸シャトル (62, 63) によって NADH は再酸化され、電子は電子伝達系に運ばれる。しかしながら、*S. cerevisiae* は *C. utilis* に比べてグルコースの比消費速度が高いため、解糖系を介した NADH の比生産速度が高く、これらのシステムによる細胞質での NADH の再酸化が追い付かず、結果として、過剰に NADH が蓄積し、 NAD^+/NADH の均衡が崩れてしまう。*S. cerevisiae* はこの過剰な NADH の蓄積を避けるために、解糖系中の NADH を生成物とするグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼを抑制し (64)、NADH を基質とするアルコールデヒドロゲナーゼによって、エタノールを生成する。この結果、解糖系の後半に位置する 1, 3-BPG、3PG/2PG、PEP の細胞内代謝物量が *C. utilis* に比べて、*S. cerevisiae* は低くなったことと考えられる (図 2. 4)。加えて、 NAD^+ や NADH の量 (図 2. 4) や NADH の正味の比生産速度 (図 2. 5.) も *S. cerevisiae* と *C. utilis* で大きく違いは見られなかったもので、酵母内において、NADH の正味の比生産速度や NAD^+ や NADH の細胞内代謝物量は厳密に制御されていることが考えられる。従って、この結果もまた *S. cerevisiae* はエタノールやグリセロールが生産することによって過剰な細胞質の NADH を再酸化していることを支持している。

一方でミトコンドリア内において生成した NADH はミトコンドリアの内膜に局在する NADH デヒドロゲナーゼである NDII (65) や ミトコンドリアのアルコールデヒドロゲナーゼシャトル (66) により再酸化され、電子は電子伝達系に運ばれる。しかしながら先行研究において、十分な好気条件においても *S. cerevisiae* はエタノール

を生成することから、その生産に伴い NADH は再酸化されるので、ミトコンドリアの NADH の再酸化は不十分であると提言されている (67)。従って、*S. cerevisiae* は TCA サイクルで生成された過剰な NADH を蓄積するため、TCA サイクル中の NADH を生成する酵素であるイソクエン酸デヒドロゲナーゼとオキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼの活性は阻害されると考えられる。一方で、ヌクレオチドにおいて *C. utilis* に比べて、*S. cerevisiae* の細胞内の代謝物量は ATP が少なく、ADP は同等、AMP は多いといった結果が得られた。この結果は *S. cerevisiae* はクラブトリー効果により酸素を最終電子受容体として利用しないため、酸化的リン酸化が十分に機能しないことから、ATP の生成能力が低くなることに起因する。酸化的リン酸化の低下に伴い、電子伝達系も制限され、呼吸鎖複合体 II を構成するコハク酸デヒドロゲナーゼの活性も低下する (68)。加えて、先行文献においてクラブトリー陰性酵母である *Pichia pastoris* と同酵母の *S. cerevisiae* の GAL4 と遺伝子配列において相同性の高い遺伝子を過剰発現することによって、クラブトリー効果を示すようになった *P. pastoris* の代謝フラックス解析を比較した際に、クラブトリー陽性の *P. pastoris* において TCA サイクルのフラックスが低下した (8)。これらの結果をまとめると、*S. cerevisiae* ではイソクエン酸デヒドロゲナーゼとオキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼの活性が低下するため、コハク酸やフマル酸、リンゴ酸の細胞内の代謝物量が低下し、結果として TCA サイクルのフラックスが低下したことが考察できる。一方で、図 2. 5.において *S. cerevisiae* は *C. utilis* に比べてグルコースの比消費速度が高いにも関わらず、TCA サイクルを介した NADH の比増殖速度に大きく違いは見られなかった。先行文献においても、*S. cerevisiae* はホスホエノールピルビン酸から TCA サイクルを逆流させることによって、NADH を酸化することが報告されている (69)。今回の結果は *S. cerevisiae* は TCA サイクルの正方向と逆方向のバランスを調整することによって、TCA サイクルを介した過剰な NADH の蓄積を避けていることが考えられる。

続いて、ペントースリン酸経路では 6PGA や Ru5P/Xu5P で *S. cerevisiae* は *C. utilis* に比べて細胞内代謝物量が低くなった。加えて、1 位を ^{13}C で標識したグルコースを用いた解糖系とペントースリン酸経路のフラックスの測定においても同様にペントースリン酸経路のフラックスは *S. cerevisiae* は *C. utilis* より低くなった (表 2. 4.)。従って、*S. cerevisiae* は *C. utilis* に比べて、ペントースリン酸経路を介して生成される R5P や NADPH の生成速度が低くなると考えられる。R5P はヌクレオチドの前駆体であることから、比増殖速度に影響を与える。従って、*S. cerevisiae* の比増殖速度は *C. utilis* に比べて低くなった要因の一つと考察できる。一方で、ペントースリン酸経路のフラックスが *S. cerevisiae* の方が *C. utilis* より低い、NADPH の細胞内代謝物量は *S. cerevisiae* が *C. utilis* より高くなる (図 2. 4.)。そのため、*S. cerevisiae* は別の経路によってペントースリン酸経路で不足している NADPH を生成していることが考えられる。例えば、アルデヒドデヒドロゲナーゼが NADPH を生成する候補として挙げられる (70)。*S. cerevisiae* のみ培地中にアルデヒドデヒドロゲナーゼによって生成される酢酸が蓄積するので、この酵素がペントースリン酸経路で不足している NADPH を補っていることが一つの理由であると考察できる。また、菌体形成にも NADPH は使用され (71)、*C. utilis* の比増殖速度は *S. cerevisiae* よりも高いために、菌体形成に必要な NADPH 量も同時に *C. utilis* が多くなる。従って、これらの結果から *S. cerevisiae* はペントースリン酸経路での NADPH の比生産速度が小さいにも関わらず、NADPH の細胞内代謝物量が高くなったものと考察できる。

別表 2 より、アミノ酸の細胞内代謝物量は PC2 の分離に貢献していた。図 2. 3. A より、PC2 の分離は両酵母の代謝の違いを示しているのではなく、増殖期の違いに起因している。従って、アミノ酸の細胞内代謝物量は増殖期に依存することが推測できる (図 2. 4.)。多くのアミノ酸では増殖に応じて増加、もしくは変化しなかったもので、これらのアミノ酸は菌体の増殖に関わらず生合成されるものと考察できる。一方で、誘導期のメチオニンやヒスチジン、ロイシンの細胞内代謝物量は対数増殖期や定常期

に比べて高かった。本研究では前培養液に YPD 培地を使用し、植菌時には培養液をそのまま添加した。YPD 培地はグルコース、ポリペプトン、酵母エキスからなる天然培地であるため、誘導期に蓄積したアミノ酸は前培養液の YPD 培地に由来する成分であると推測でき、対数増殖期や定常期で減少していることから、誘導期で消費されたものと考えられる。それ故、回分培養中の酵母は誘導期のみ前培養の影響を受けたことが示唆された。

2. 5. 小括

本章ではクラブトリー陽性酵母である *S. cerevisiae* と陰性酵母である *C. utilis* の代謝に着目し、それぞれの酵母を用いた好気条件下での回分培養中の細胞内の代謝状態をメタボローム解析によって観測し、そこから得られた情報を元に、クラブトリー効果が酵母の代謝に与える影響を考察した。

本章でのメタボローム解析において *S. cerevisiae* は *C. utilis* に比べて解糖系や TCA サイクルの NADH の生成に関連する細胞内代謝物量が低下した。グルコースの取り込みに応じて *S. cerevisiae* では解糖系で NADH を過剰に生成した。この NADH によって解糖系と TCA サイクルで NADH の生成を伴う酵素の活性に阻害がかかった結果、細胞内代謝物量の低下は生じたものと考察できた。従って、メタボローム解析の結果から、クラブトリー効果は解糖系や TCA サイクルの NADH の酸化・還元に影響を与えることが考えられたので、NADH の比生産速度を計算したところ、*S. cerevisiae* と *C. utilis* では大きな差は見られなかった。これは解糖系で *S. cerevisiae* は *C. utilis* に比べて、グルコースの比消費速度に応じて過剰の NADH を生成したが、エタノールやグリセロールの生成に伴い NADH を消費したことによる。結果として、酵母において、 NAD^+/NADH の均衡は正常に保たれていることが考察できた。

本章ではメタボロミクスによって、網羅的に代謝物を調べることによって、クラブトリー陽性酵母である *S. cerevisiae* では過剰な NADH が中央代謝経路の細胞内代

謝物量に影響を与えていることを示した。更に、解糖系で生成された過剰な NADH がエタノールやグリセロールの生成に伴って再酸化されていることを定量的に示すものであった。これらの結果は過去にも考察されてきたものではあるが、メタボローム解析によって代謝の観点から改めて考察された報告であることから、クラブトリー効果が酵母の代謝に与えた研究として意義のあるものと言える。

第3章 *Saccharomyces cerevisiae*の連続培養におけるクラブトリー効果の低減

3.1. 諸言

第2章ではクラブトリー陽性酵母と陰性酵母の代謝を比較することで、クラブトリー効果における酵母代謝解析を実施した。ここで得られた知見を用いてクラブトリー効果を低減することに取り組んだ。本章ではグルコースを制限基質とした連続培養を採用した。1.5.でも示したが、連続培養とは培地の流入と培養液の流出を同時に連続的に行う培養方法である。連続培養の定常状態において比増殖速度は発酵槽容積に対する単位時間当たりの培養液の流出量を示す希釈率そのものである。従って、比増殖速度は発酵槽容積並びに培養液の流出量の人為的に設定可能な値によって制御することが可能となる。*S. cerevisiae*のグルコースを制限基質とした連続培養において低い希釈率では呼吸によってエネルギー獲得を行う呼吸代謝を行う。一方で、培地の供給速度を増加し、ある一定の希釈率（限界希釈率）を上回ると、*S. cerevisiae*はクラブトリー効果を示し、呼吸代謝からエタノール発酵を伴う呼吸発酵代謝へ変化する。先行研究により、限界希釈率を上回り、クラブトリー効果を示すと、対糖菌体収率が低下し、エタノールを生産することが報告されている（72, 73）。それ故、*S. cerevisiae*の連続培養で商業生産を目指し、糖あたりの菌体や目的代謝物の収率を上げようとした場合、クラブトリー効果が妨げとなり、糖の供給を制限するため希釈率を下げざるを得ない。連続培養において希釈率は日産量に直結する要素であるため、現状では*S. cerevisiae*の連続培養を用いた商業生産では日産量は低下してしまう。このような現状を改善することが望まれているが、これまでに達成できていない。従って、第3章では*S. cerevisiae*のグルコースを制限基質とした連続培養において呼吸発酵代謝を示す高い希釈率を維持したままクラブトリー効果を低減することを目指した。これまでに異なる希釈率での連続培養における*S. cerevisiae*のメタボローム解析を

実施した報告はないので、まずは *S. cerevisiae* の異なる希釈率の連続培養から採取した菌体から代謝物を抽出し、メタボローム解析を行った。得られたメタボロームデータによる主成分分析の結果と第 2 章におけるクラブトリー効果における酵母代謝解析の結果から、クラブトリー効果の低減が期待される代謝物を選抜し、呼吸発酵代謝を示す高い希釈率における連続培養中に添加することでエタノールの生産や対糖菌体収率に与える影響を検討した (図 3. 1.)。

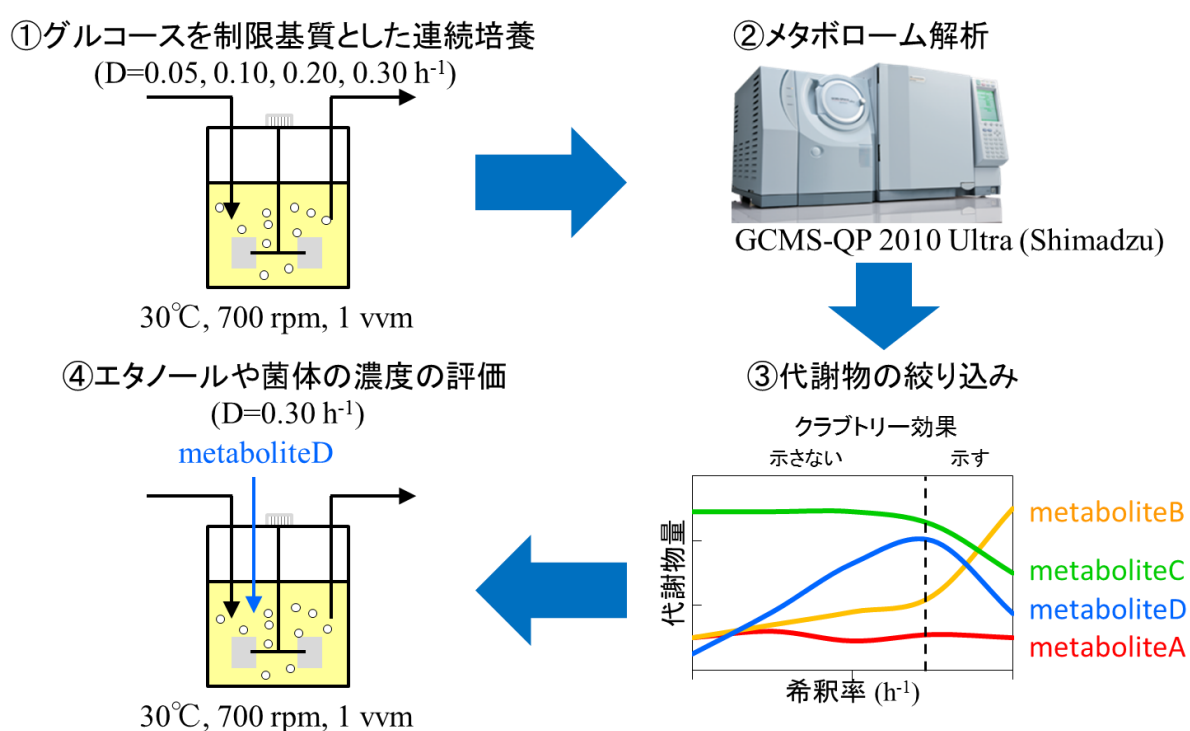


図 3. 1. エタノール低減のための戦略

①異なる希釈率におけるグルコースを制限基質とした連続培養の実施、②希釈率の異なる連続培養から採取された菌体によるメタボローム解析、③得られた代謝物量情報からクラブトリー効果に影響を及ぼす代謝物の選定、④呼吸発酵代謝を示す希釈率において③で選抜した代謝物を添加した際のエタノールや菌体濃度の評価

3. 2. 実験手法

3. 2. 1. 菌株および培養

使用した酵母並びに前培養、本培養の培地組成は第 2 章と同じである。前培養は 100 mL の YPD 培地の入った三角フラスコ (HARIO) で 30℃にて 18 時間行った。本培養は 2 L の Jar-fermentar (Mitsuwa) に張り込んだ 1 L の培養液に初期 OD₆₀₀ が 0.1 となるように前培養液をそのまま植菌し、回分培養を開始した。代謝物の添加試験では通常の培地組成に加え、トレハロース二水和物、オルニチン塩酸塩、フマル酸、リンゴ酸 (Fujifilm Wako) を 100 mg/L の終濃度となるように添加した。培養温度は 30℃、攪拌数を 700 rpm、通気を 1 L/min で行い、4 M の NaOH にて pH を 5.0 に制御した。回分培養の対数増殖後期にてそれぞれの希釈率で連続培養を開始し、定常状態になったことを確認した後、菌体をメタボローム解析のために採取した。

3. 2. 2. バイオマスおよびエタノールの測定

乾燥菌体重量はサンプリング後、超純水にて 2 回洗浄、遠心分離 (6000 g、5 min、4℃) を行い、105℃にて一晩静置した後、重量を測定した。培地中のエタノール濃度ならびにグルコース濃度の測定は第 2 章で示した通りである。また、添加した代謝物を含めた単位炭素当たりの対糖菌体収率を計算するための単位炭素当たりのバイオマスの分子量を 26.4 とした (57)

3. 2. 3. メタボローム解析

GC-MS によるメタボローム解析に用いたサンプリング方法や分析、解析は全て第 2 章と同様である。主成分分析のための前処理には Pareto scaling method を用い、変換は 1/4 root にて行った。

3. 3. 実験結果

3. 3. 1. 増殖および培養結果

呼吸代謝から呼吸発酵代謝に変わった際の、代謝への影響を調べるために、十分な好気条件におけるグルコースを制限基質とした連続培養において希釈率を 0.05、0.10、0.20、0.30 h⁻¹ に変化させて、連続培養を実施した (図 3. 2.)。本章の培養条件において溶存酸素濃度が 4 ppm 以上あることを確認しており、酸素が枯渇していないことから好気条件が十分に保たれていた。*S. cerevisiae* NBRC101557 を使用した連続培養では D=0.20 h⁻¹ 以下では希釈率の上昇に伴い、菌体濃度はわずかに上昇した。一方でエタノールの生産は全く確認できなかったのも、呼吸代謝が行われており、クラブトリ効果を示していないものと考えられる。一方で、D=0.30 h⁻¹ に希釈率を上昇させると、D=0.20 h⁻¹ と比較して菌体濃度が著しく低下した。加えて、培地中にエタノール生産を確認することができたので、呼吸発酵代謝が行われており、*S. cerevisiae* は D=0.30 h⁻¹ ではクラブトリ効果を示した。本章での連続培養の結果は *S. cerevisiae* を用いて異なる希釈率で連続培養を実施した先行文献の結果とよく一致していた (72, 73)。

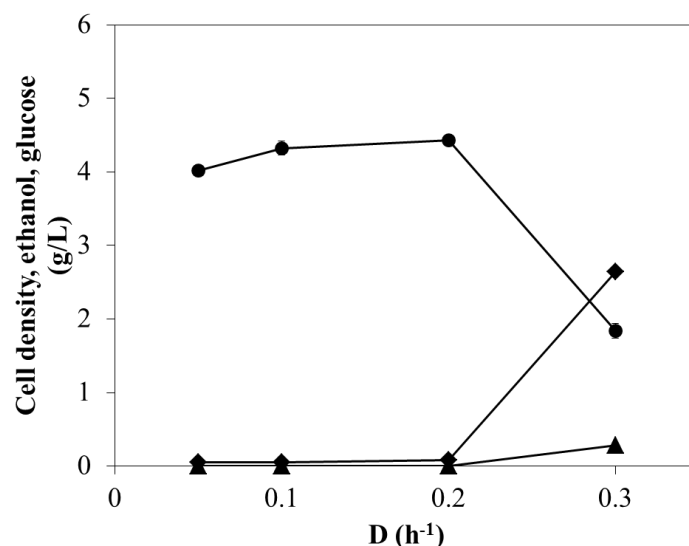


図 3. 2. 異なる希釈率におけるグルコースを制限基質とした連続培養の結果

菌体濃度: ●、エタノール濃度: ◆、グルコース濃度: ▲で示した。全ての結果は反復数 3 で行った結果であり、エラーバーは標準偏差を示す。サンプリングは定常状態に達した後に滞留時間だけ間隔を空け、実施した。

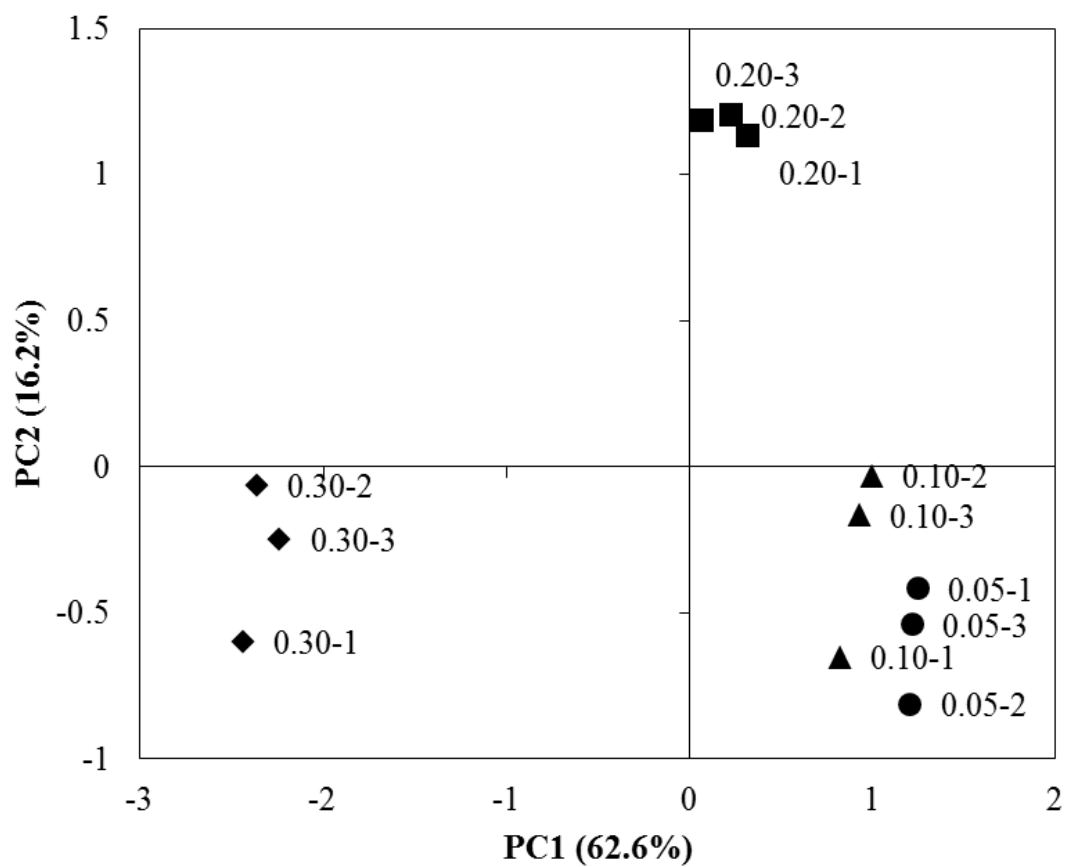
3. 3. 2. GC-MS によって同定されたメタボロームデータによる主成分分析

第 2 章ではクラブトリ効果幅広い代謝に影響を及ぼしている可能性が考えられたことから、網羅的に様々な代謝物を調べる必要があったので、LC-MS/MS と GC-MS を用いて分析を行った。しかしながら、第 3 章ではメタボローム解析で選抜した代謝物を培地に添加して検討する必要がある。そのため、熱安定性の高い代謝物を選抜しなければならない。表 2. 3. より LC-MS/MS でのみ同定されている代謝物の多くは熱安定性の低いものであったので、連続培養でそれらの代謝物の添加効果を確認することは難しい。一方で、GC-MS で分析される化合物は熱安定性の高いものに限定されるため、本章では GC-MS のみを用いてメタボローム解析を実施することとした。メタボローム解析の結果、アミノ酸、有機酸、糖を中心に 49 個の代謝物が GC-MS によって同定された (表 3. 1.)。呼吸代謝から呼吸発酵代謝に変わった際の代謝物への影響を調べるために、異なる希釈率から採取した菌体からの細胞内の代謝物量情報を用いて主成分分析を行った (図 3. 3. A)。主成分分析の PC1 に沿って希釈率ごとにクラスターが分離したので、PC1 の分離には希釈率の変化に関連した代謝物が貢献していることが予想された。加えて、希釈率の上昇に伴い、呼吸代謝から呼吸発酵代謝へと代謝が変わったので、PC1 の分離にはクラブトリ効果に関連していることが示唆された。PC1 のローディングデータ (図 3. 3. B、別表 3) によると、トレハロースやバリン、4-アミノ安息香酸が PC1 の正に寄与しており、グリセロールや N- α -アセチル-L-オルニチン、オルニチンが PC1 の負に寄与していることが明らかになった。本章は異なる希釈率での連続培養における *S. cerevisiae* のメタボローム解析を実施し、主成分分析において希釈率ごとにクラスターが分離した初めての報告である。

表 3. 1. GC-MS によって同定された代謝物一覧

代謝物	
アミノ酸	Alanine, Asparagine, Aspartate, Citrulline, Glutamate, Glutamine, Glycine, Histidine, Homoserine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Ornithine, Phenylalanine, Proline, Serine, Threonine, Tryptophan, Tyrosine, Valine
有機酸	Citrate + Isocitrate, Fumarate, Lactate, Malate, Pyruvate + Oxalacetate, Succinate
糖	Glycerol, Sorbitol, Trehalose
その他	2-Aminobutyrate, 2-Aminoethanol, 2-Hydroxypiridine, 4-Aminobenzoate, 4-Aminobutyrate, Adenine, Allose, β -alanine, Fructose-6-phosphate, Glutarate, Inositol, N- α -Acetyl-L-Ornithine, n-Butylamine, n-Propylamine, Octadecanate, Pyroglutamate, Shikimate, Urea

(A)



(B)

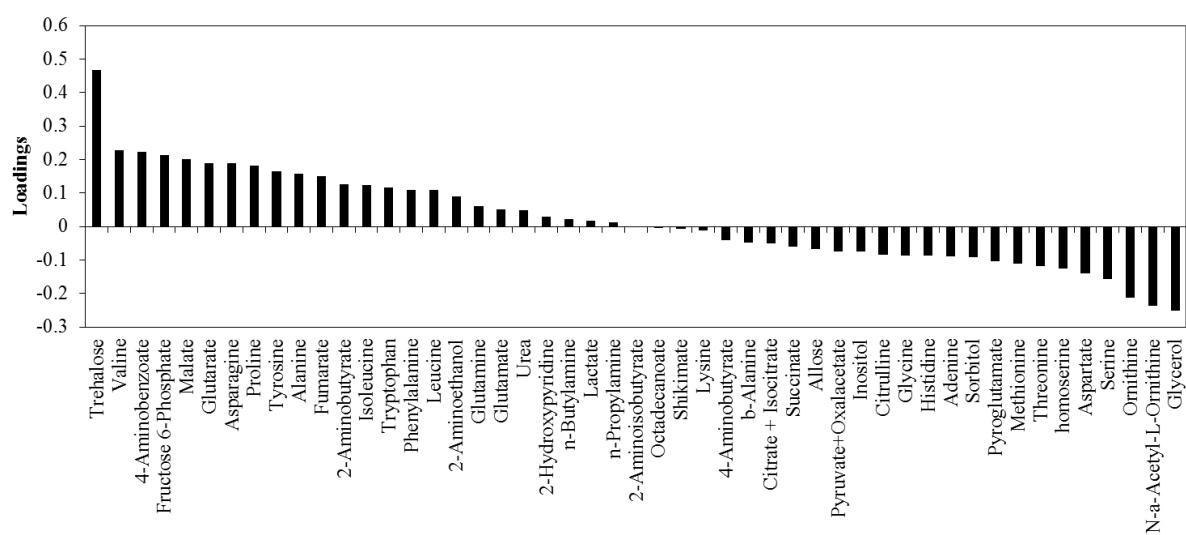


図 3. 3. 異なる希釈率における主成分分析の結果

(A) スコアプロット (寄与率: PC1=62.6%、PC2=16.2%)、D=0.05 h⁻¹: ●、D=0.10 h⁻¹: ▲、D=0.20 h⁻¹: ■、D=0.30 h⁻¹: ◆で示した。(B) PC1 に対するローディングデータ

3. 3. 3. 代謝物を添加する候補の選択

呼吸発酵代謝を行う $D=0.30 \text{ h}^{-1}$ においてクラブトリー効果の低減が期待される代謝物の選抜を行った。希釈率が増加するにつれて細胞内の代謝物量が増加または減少する代謝物はエタノール濃度を変化させる可能性のある代謝物と考えられるので、これらの代謝物を添加する候補とした。代謝物マップを図 3. 4 に示した。その結果、PC1 の正に寄与していた代謝物（トレハロース）は希釈率の上昇に伴い、細胞内代謝物量が減少する傾向に、PC1 の負に寄与していた代謝物（グリセロール、N- α -アセチル-オルニチン、オルニチン）は希釈率の上昇に伴い、細胞内代謝物量が増加する傾向にあった。それらの代謝物のうち、熱安定性の観点から添加できる代謝物はトレハロースやグリセロール、オルニチンであった。しかし、グリセロールはエタノールの副生成物として知られており (74)、また炭素源として培養に影響を与える可能性があったので、ここでは候補から排除した。その結果、まずはトレハロースとオルニチンを培地に添加する代謝物の候補として決定した。続いて、希釈率が 0.20 h^{-1} 以下と 0.30 h^{-1} ではクラブトリー効果の影響によって、菌体濃度やエタノール濃度が大きく異なったので、クラブトリー効果に関係する代謝物の量にも影響を及ぼしたことが予想される。従って、呼吸代謝を示す希釈率の範囲 ($D \leq 0.20 \text{ h}^{-1}$) において希釈率の上昇につれ、細胞内の代謝物量が増加するが、呼吸発酵代謝を示す希釈率 ($D=0.30 \text{ h}^{-1}$) では細胞内代謝物量が減少する代謝物、または希釈率が 0.20 h^{-1} 以下において希釈率が上昇するにつれ、細胞内の代謝物量が減少するが、 $D=0.30 \text{ h}^{-1}$ において増加する代謝物も連続培養においてクラブトリー効果を低減する候補となる。この傾向が見られる代謝物にはリンゴ酸、フマル酸、コハク酸があった。第 2 章において、クラブトリー効果は中央代謝の NADH の生成に関連する代謝物に影響を与えることが示唆され、これらの代謝物はクラブトリー陽性の酵母で細胞内代謝物量が低くなることから、NADH の生成に阻害がかかっていることを考察した。リンゴ酸、フマル酸、コハク酸は TCA サイクルに含まれる代謝物であり、NADH の生成に関連している。従って、これら

の代謝物はクラブトリ効果の影響を受けて、呼吸発酵代謝を示す希釈率の連続培養では呼吸代謝を示す希釈率の連続培養に比べ細胞内代謝物量が低下したことが考えられる。本章ではこれらの3つの代謝物のうち、 $D=0.20\text{ h}^{-1}$ に対して $D=0.30\text{ h}^{-1}$ での細胞内代謝物量の低下に大きく影響を受けたリンゴ酸やフマル酸をトレハロースやオルニチンに加え、添加する代謝物の候補として追加した。

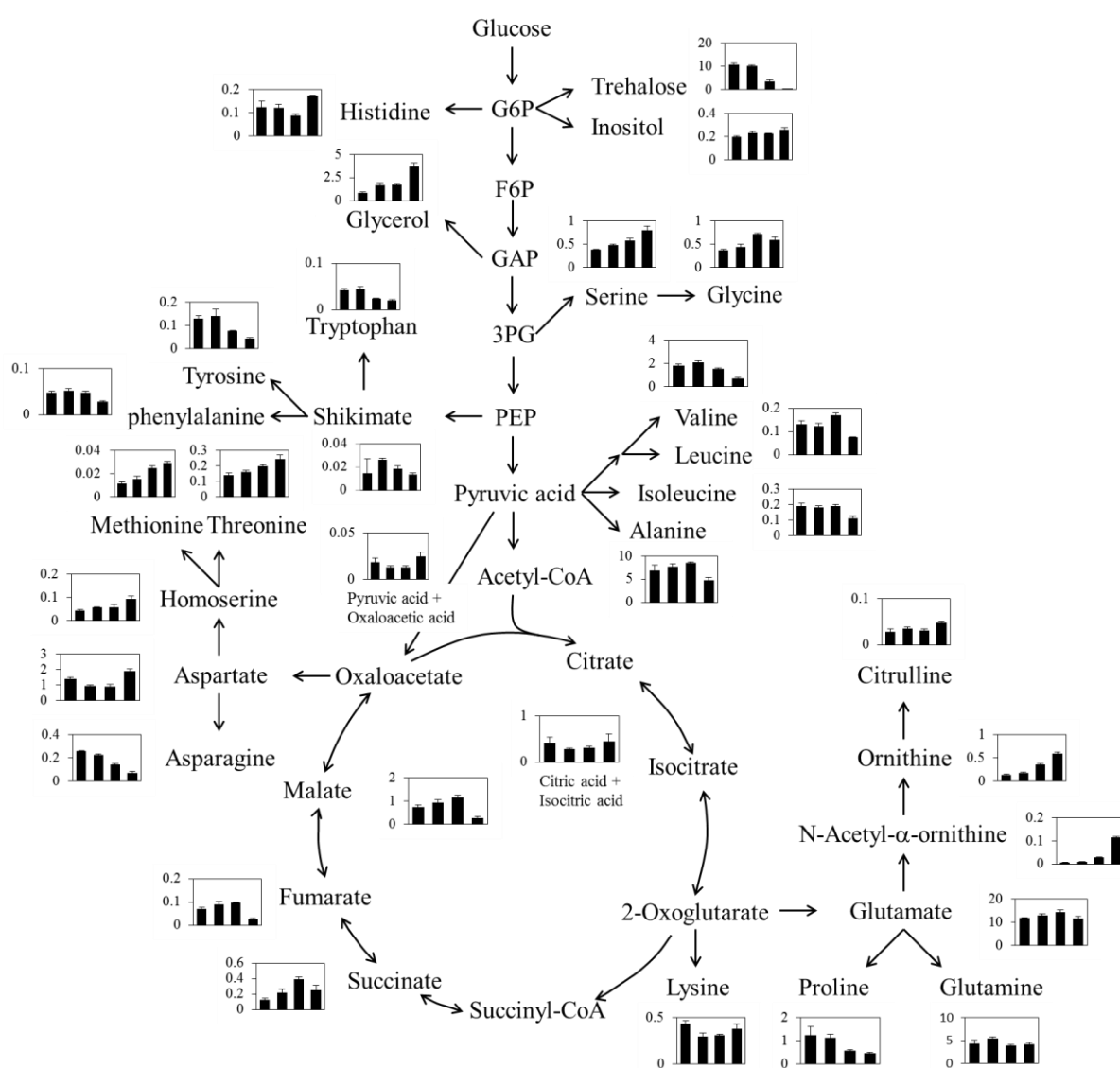


図 3. 4. GC-MS によって同定された代謝物を載せた中央代謝マップ

縦棒は左から順に $D=0.05\text{ h}^{-1}$ 、 0.10 h^{-1} 、 0.20 h^{-1} 、 0.30 h^{-1} を示す。縦軸は相対値を示した。全ての結果は反復数 3 で行った結果であり、エラーバーは標準偏差を示す。

3. 3. 4. 呼吸発酵代謝を行う希釈率での連続培養における候補代謝物の添加

これまでの結果を受けて添加する代謝物の候補として決定した4つの代謝物（トレハロース、オルニチン、フマル酸、リンゴ酸）をそれぞれ培地中に最終濃度が100 mg/Lとなるように加えて、呼吸発酵代謝を行う $D=0.30\text{ h}^{-1}$ にて連続培養を行い、培地中のエタノール濃度を測定した（図 3. 5）。添加していないコントロール ($2.89 \pm 0.01\text{ g/L}$) と比べて、トレハロース ($2.91 \pm 0.01\text{ g/L}$) やオルニチン ($2.90 \pm 0.03\text{ g/L}$) を添加した際の連続培養では培養液中のエタノール濃度には変化は見られなかったが、リンゴ酸 ($2.81 \pm 0.02\text{ g/L}$) とフマル酸 ($2.74 \pm 0.02\text{ g/L}$) を添加した際の連続培養ではエタノール濃度を低減することに成功した。加えて対糖菌体収率においてもコントロール ($0.173 \pm 0.002\text{ gDCW/g}$) に比べて、エタノール濃度を低減したリンゴ酸 ($0.185 \pm 0.003\text{ gDCW/g}$) やフマル酸 ($0.181 \pm 0.004\text{ gDCW/g}$) を添加した連続培養ではそれぞれ高くなった（図 3. 6A）。また、添加した代謝物を含めた単位炭素当たりの対糖菌体収率においてもコントロール ($0.196 \pm 0.002\text{ gDCW/g}$) に比べて、エタノール濃度を低減したリンゴ酸 ($0.208 \pm 0.004\text{ gDCW/g}$) やフマル酸 ($0.204 \pm 0.004\text{ gDCW/g}$) を添加した連続培養ではそれぞれ高くなった（図 3. 6B）。

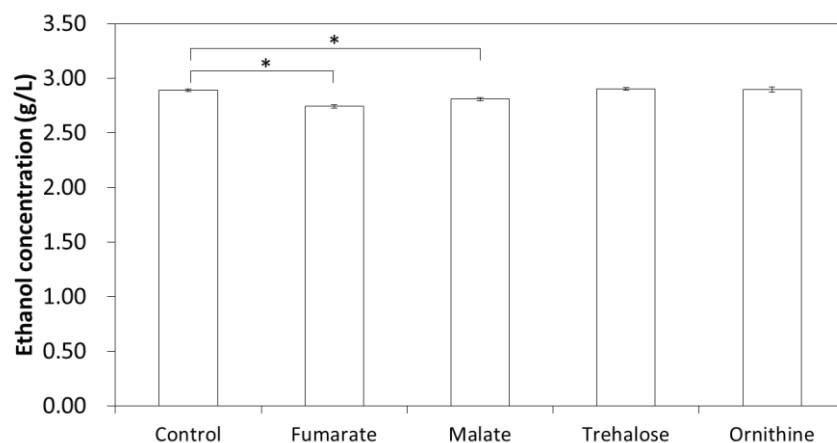


図 3. 5. 呼吸発酵代謝を行う希釈率 ($D=0.30 \text{ h}^{-1}$) の連続培養中にフマル酸やリンゴ酸、トレハロース、オルニチンを終濃度 100 mg/L となるように添加した際のエタノール濃度
 全ての結果は反復数 3 で行った結果であり、エラーバーは標準偏差を示し、*は有意差 ($P<0.05$) を示す。サンプリングは定常状態に達した後に滞留時間だけ間隔を空け、実施した。

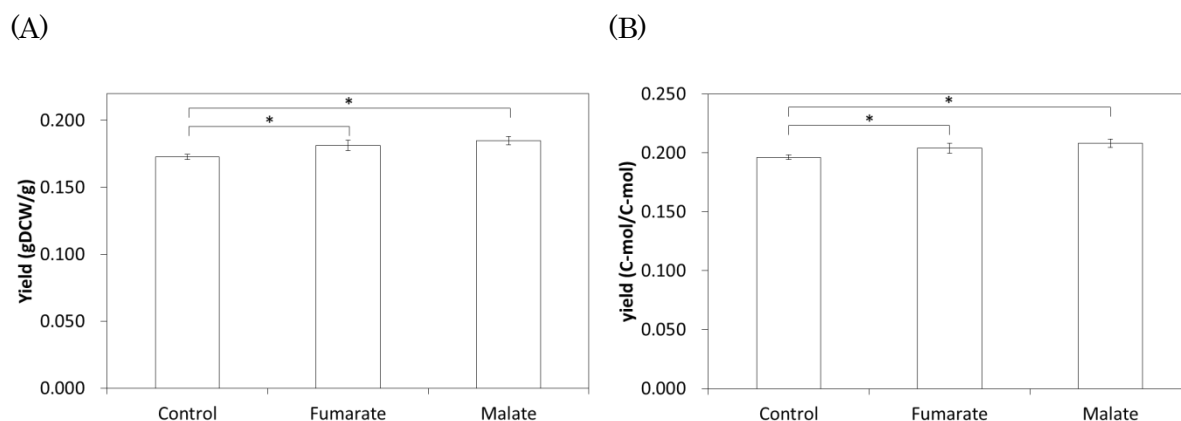


図 3. 6. 呼吸発酵代謝を行う希釈率 ($D=0.30 \text{ h}^{-1}$) の連続培養中にフマル酸、リンゴ酸を終濃度 100 mg/L となるように添加した際の対糖菌体収率 (A)、添加した代謝物を含めた単位炭素当たりの対糖菌体収率 (B)
 全ての結果は反復数 3 で行った結果であり、エラーバーは標準偏差を示し、*は有意差 ($P<0.05$) を示す。サンプリングは定常状態に達した後に滞留時間だけ間隔を空け、実施した。

3. 4. 考察

S. cerevisiae の連続培養において、希釈率を上昇させると、クラブトリー効果により呼吸代謝から呼吸発酵代謝に変わり、菌体濃度が低下し、培地中にエタノールを生産する (図 3. 2.)。リンゴ酸やフマル酸、コハク酸は呼吸代謝では希釈率の上昇に伴い、細胞内の代謝物量は増加するが、限界希釈率を上回り、呼吸発酵代謝になると減少した (図 3. 4.)。これは第 2 章でも示した通り、クラブトリー効果の影響を受け、TCA サイクルで NADH の生成に障害がかかったために、これらの代謝物の細胞内代謝物量も低下したものと考察できた。また、解糖系から TCA サイクルの入り口となるクエン酸とイソクエン酸が希釈率の増加に伴い、細胞内代謝物量が大きく影響を受けなかったことも、第 2 章のクラブトリー陽性酵母と陰性酵母のメタボローム解析の結果とも一致していることから上記の考察の裏付けとなる。これより、フマル酸やリンゴ酸の培地への添加は不足している TCA サイクルの細胞内代謝物量を補う役割があると考えられる。その結果として、添加した代謝物を含めた単位炭素あたりの対糖菌体収率についてもリンゴ酸やフマル酸を添加した際にコントロールと比べて増加した (図 3. 6B)。従って、リンゴ酸やフマル酸を添加すると、取り込んだ炭素を効率的に菌体形成に使用していることが考察できる。続いて、先行研究において、ペントースリン酸経路のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼのフラックスが希釈率の上昇とともに減少した半面、マリックエンザイム (75) のフラックスは希釈率の上昇とともに増加していた (72)。これは呼吸発酵代謝を示す希釈率では呼吸代謝を示す希釈率に比べて、NADPH をグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼだけではなく、マリックエンザイムによって生成していることを意味する。従って、呼吸発酵代謝を示す希釈率での連続培養におけるフマル酸やリンゴ酸の培地への添加は、菌体中で不足している TCA サイクルのこれらの代謝物の不足を補っているだけでなく、マリックエンザイムを通じて NADPH の生産を向上させたのかもしれない。結果としてこれらの代謝物を加えた際には対糖菌体収率が増加した。加えて、この対糖菌体収率の増加に伴い、NADH が消費されることから (71)、第 2 章で提示したクラブトリー効果によ

る NAD^+/NADH の不均衡を緩和することとなり、エタノール濃度の低下につながったことが考察できる。しかしながら、フマル酸やリンゴ酸を加えた培地で $D=0.30 \text{ h}^{-1}$ で連続培養を行った際のフマル酸やリンゴ酸の細胞内の代謝物量はトレハロースやオルニチンを加えた培地で連続培養を検討した際に比べて大きな違いは見られなかった (図 3. 7.A, B)。この結果は培地から取り込んだフマル酸またはリンゴ酸は他の代謝物に変換されており、依然として細胞内の代謝物量は不足していることを示している。それ故、リンゴ酸やフマル酸の培地への添加濃度を上昇させることによって、更にクラブトリー効果を低減できる可能性がある。

先行研究において *S. cerevisiae* の TCA サイクルに関連している遺伝子を過剰発現させ、エタノールの生産に対する影響を調べた報告がなされている (76)。これらの遺伝子のうちリンゴ酸デヒドロゲナーゼとフマル酸レダクターゼを過剰発現させた *S. cerevisiae* においてそれぞれ 2% のエタノール生産を低減したと報告されていた。彼らはこの結果に対して、TCA サイクルの複数の遺伝子を過剰発現させることによって、更なるエタノール生産の低減が実現できるかもしれないと考察していた。確かに一つの遺伝子の過剰発現や欠損は局所的に流量が変化するので、細胞内の代謝バランスが崩れ、十分な効果が得られないことが懸念される。その点、本章での取り組みのように代謝物を添加すれば、代謝のバランスを崩すことなく、ボトルネックとなっている代謝物を補うことができるので、十分な効果が期待できる。

一方で、添加した 4 つの代謝物のうち、オルニチンやトレハロースを添加した際にはエタノール濃度の低減は確認できなかった (図 3. 5)。しかしながら、オルニチンの下流に位置するポリアミンはエタノール耐性に効果があると報告 (77) があり、トレハロースはエタノール耐性に効果があると報告 (78) されていた。オルニチンとトレハロースの培地中への添加の効果を確認するために、細胞内の代謝物量を調べた (図 3. 7. C, D)。オルニチンの細胞内代謝物量はオルニチンを培地に添加した場合のみ上昇していた一方、エタノールの低減は確認できなかった。従って、オルニチンの培地

の添加は $D=0.30 \text{ h}^{-1}$ での連続培養でのエタノールの低減には効果が見られなかったことが考えられる。一方で、トレハロースの細胞内の代謝物量は無添加の培地を用いて連続培養を行った場合に比べて、4つの代謝物を添加した連続培養において細胞内代謝物量は全て上昇していた。Muhmud らの報告では *S. cerevisiae* のエタノールに対する耐性は 6%以上の濃度にて検討している (78)。今回の検討では先行研究に比べて明らかに低濃度であったため、効果が十分に得られなかった可能性がある。例えば、嫌気培養の様にエタノールを高蓄積する条件ではエタノール耐性として知られているトレハロースの添加は効果が顕著に表れたのかもしれない。図 3. 4. の希釈率を変化させた連続培養において、希釈率を上昇させるとトレハロースの細胞内の代謝物量は低下した。トレハロースはエタノールの他にも栄養飢餓など様々なストレスに呼応して細胞内代謝物量が増加すると報告されている (78, 79)。連続培養において希釈率が低い場合はグルコースの供給が律速となっていることから、糖源の栄養飢餓が生じて、トレハロースが蓄積したと考えられる。一方で、 $D=0.30 \text{ h}^{-1}$ においてトレハロースの細胞内の代謝物量は他の希釈率に比べて低いので、今回のような低濃度のエタノール濃度では *S. cerevisiae* はストレスを受けていないことが予想される。それ故、トレハロースの培地への添加は $D=0.30 \text{ h}^{-1}$ の連続培養において効果が見られなかったと考察できる。

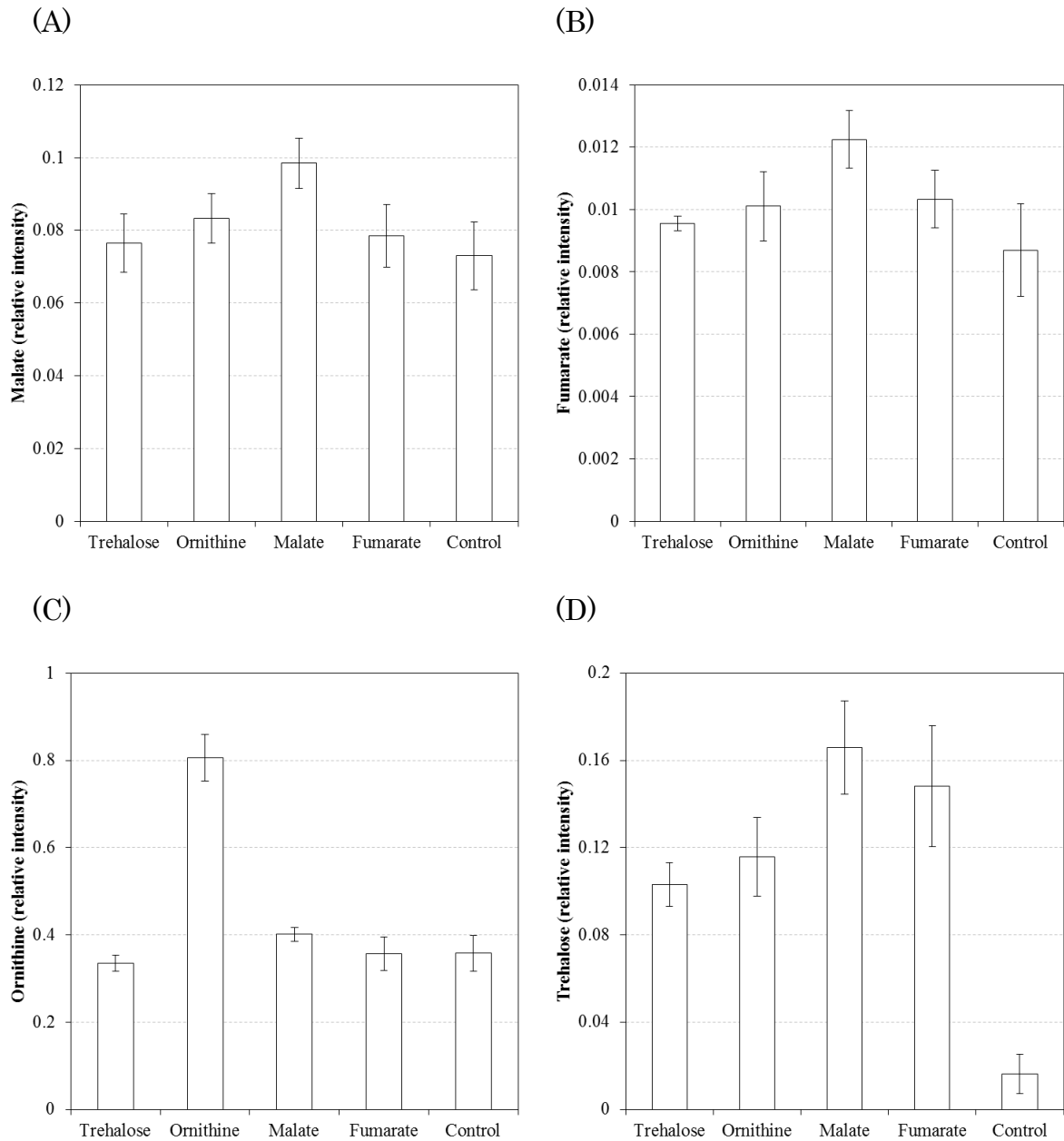


図 3. 7. トレハロースやオルニチン、リンゴ酸、フマル酸を加えた培地と無添加の培地で $D=0.30$ h^{-1} で連続培養した際のリンゴ酸 (A) やフマル酸(B)、オルニチン (C)、トレハロース (D)の相対値

3. 5. 小括

本章では *S. cerevisiae* の希釈率を上昇させると呼吸代謝から呼吸発酵代謝に変わることに着目して、異なる希釈率での連続培養の菌体を用いてメタボローム解析を実施

し、得られたメタボロームデータから主成分分析を実施した。本研究は異なる希釈率での連続培養において *S. cerevisiae* のメタボローム解析を実施し、希釈率ごとに主成分分析のクラスターが分かれた初めての報告例である。本章でのメタボローム解析を通して得られた結果ならびに、第 2 章でのクラブトリー効果における酵母代謝解析の結果を加味して、クラブトリー効果の低減に期待できる 4 つの代謝物候補（フマル酸、リンゴ酸、トレハロース、オルニチン）を絞り込んだ。これらの 4 つの代謝物のうち、フマル酸とリンゴ酸を加えた培地で行った $D=0.30\text{ h}^{-1}$ での連続培養において、無添加の培地で行った連続培養に比べて、それぞれ 5.2%、2.9%のエタノール濃度を低減し、5.1%、7.0%の対糖菌体収率の向上に成功した。

本章で使用したフマル酸やリンゴ酸の市場価格は 400～800 円、550 円～750 円と見積もられている (80)。今回培地の添加したフマル酸やリンゴ酸の濃度は 100 mg/L であったことから、安価に添加できることが期待できるため、フマル酸やリンゴ酸は商業生産の培地への添加においてコストメリットのある培養方法と言える。それ故、本章での検討は培養方法の開発においてメタボローム解析が有効であることを示すことができた。

第 4 章 総括

4. 1. 総括

本論文は、クラブトリー効果における酵母代謝解析を行い、*S. cerevisiae* の連続培養で代謝物を培地に添加することによって、クラブトリー効果を低減することを試みたものである。

第 2 章では酵母の性質が最もよく反映される回分培養をクラブトリー陽性・陰性酵母で実施した。メタボローム解析によって各増殖期での代謝物を比較することによって、クラブトリー効果が代謝に与える影響を明らかにした。メタボロームデータによる主成分分析の結果、クラブトリー効果に影響を受けたと推測できる特徴的な代謝物を絞り込むことができた (図 2. 3)。これらの代謝物からクラブトリー効果が代謝に与えた影響を考察したところ、解糖系や TCA サイクルにおける NADH の生成に関連する代謝物が影響を受けており、その細胞内代謝物量がクラブトリー陽性酵母にて低くなった (図 2. 4)。また、培養結果の比速度からクラブトリー陽性・陰性酵母での NADH の正味の比生産速度に大きな違いは見られなかった (図 2. 5)。これらの結果から、解糖系や TCA サイクルで過剰に生成される NADH 量が電子伝達系で消費される NADH 量に比べて大きいため、 NAD^+/NADH の不均衡が生じ、NADH の生成に阻害がかかり、関連する細胞内代謝物量も低くなったものと考えられる。更にクラブトリー陽性酵母ではエタノールに変換することによって、その過剰分の NADH を再酸化し、 NAD^+/NADH の比率を調整していることを定量的に示すことができた。本章で得られた結果は過去に分子生物学的にクラブトリー効果について研究されてきた結果を代謝の観点から補足するものであった。そのため、メタボローム解析はクラブトリー効果のように分子生物学的アプローチの研究対象となっている現象に対して、代謝という視点からその現象を俯瞰的に見る有効なアプローチであることを示すものであった。

第 3 章ではグルコースを制限基質とした連続培養で代謝物を培地に添加することに

よってクラブトリー効果を低減できるか検討した。連続培養において希釈率を上昇させることによって、呼吸代謝から呼吸発酵代謝へ移行した菌体を用いてメタボローム解析を実施した。同定された代謝物の細胞内代謝物量のうち、希釈率に応じて一律に増減している代謝物（トレハロース、オルニチン）を培地に添加する候補とした（図 3. 3）。また、第 2 章より NADH の生成に関連している代謝物がクラブトリー効果の影響を受けていることが考察された。これらの結果を加味するとフマル酸やリンゴ酸の細胞内代謝物量が呼吸代謝から呼吸発酵代謝に移行した際に顕著に低下したので、フマル酸やリンゴ酸も培地に添加する候補とした。これらの代謝物をそれぞれ添加し呼吸発酵代謝を示す希釈率で培養したところ、フマル酸とリンゴ酸を添加した場合、無添加に比べてエタノール濃度を低減し、対糖菌体収率を増加させることに成功した。

本論文はメタボロミクスを通じてクラブトリー効果を代謝の観点から改めて考察し、それらの代謝物情報を活用することによって商業生産の課題となるクラブトリー効果の低減に成功したものである。本論文で得られた代謝物情報はクラブトリー効果を理解する上で重要であり、*S. cerevisiae* による有用物質の商業生産に向けた取り組みの中で有益な情報になると考えられる。

4. 2 今後の展望

本論文において、メタボロミクスによるアプローチを用い、比増殖速度を維持したまま、クラブトリー効果の低減を実現した。従来の培養工学によるアプローチでは比増殖速度を制限し、クラブトリー効果を示さない培養環境を設定した後に、なるべく高い比増殖速度で培養を行うために、アルコール制御や RQ 制御による流加培養が行われている。本論文で得られた知見を従来の培養方法に適用することによって、より高い比増殖速度でクラブトリー効果を回避した流加培養が期待できる。それ故、高い比増殖速度で培養することが可能となり、培養時間の短縮による培養生産性の向上が見込まれる。このようにメタボロミクスを従来の培養工学に組み合わせ、これまで対

象とされていなかった代謝に焦点を当てることによって、新たな知見による培養方法の開発が期待される。

メタボロミクスは一度の分析で膨大な代謝物量情報を取得できる反面、その中から目的に合った代謝物を抽出することは難しい。本論文においては主成分分析によって、目的達成を見込める代謝物を絞り込み、生物学的な解釈を加えることで最終的に決定した。しかしながら、この方法では研究者の経験によって解釈が異なり、場合によっては求められた結果が得られないことがある。従って、より高精度で目的達成を見込める代謝物を抽出する解析技術の開発が課題となる。近年ではメタボロミクスでよく用いられている主成分分析や部分的最小二乗判別分析に加え、機械学習によるデータマイニング (81) が導入され始めており、今後はこれらの解析技術を組み合わせることによって、更に高精度での解析が期待される。

長年の間、*S. cerevisiae* はモデル生物として、分子生物学分野において研究対象の中心となっていることもあり、遺伝子組換え技術が他の微生物に比べ、遥かに充実していることから、商業生産を目指すための宿主としても選ばれることが多い (82)。しかし、本論文でも示した通り、*S. cerevisiae* を用いた商業生産ではクラブトリー効果が課題となることが多く、現時点では比増殖速度を維持したまま、クラブトリー効果を完全に回避した報告はなされていない。そのため、近年本論文でも取り扱った *C. utilis* のような Non-conventional yeast の産業利用に注目が集まっている (83)。これらの酵母にはクラブトリー効果を示さないものも多く存在し、好気条件下において低いグルコース能にも関わらず、高い対糖菌体収率を示し、目的とする代謝物やタンパク質を効率的に生産できる (15)。本論文でも使用した *C. utilis* は紙の製造工程で副生成する廃液に含まれるキシロースやアラビノースの資化性に長けており、得られた酵母はタンパク質やヌクレオチド、ビタミンが豊富に含んでいることから、酵母エキスや飼料用途に用いられている (84)。*Kluveromyces marxianus* は高い増殖速度、耐熱性を持ち、チーズ生産の副生産物であるホエイを資化でき、酢酸エチルや 2-フェ

ニルエタノールを高生産することで知られている (85)。*Yarrowia lipolytica* は様々な糖源に対する資化性を持ち、細胞内に生合成した脂質を高濃度で蓄えることができる油脂酵母として知られているだけでなく、EPA やクエン酸、 α -ケトグルタル酸などの化成品の商業生産に利用されている (86)。また、*Pichia pastoris* は最少培地で高密度培養が可能で、発現システムが厳密に制御されており、タンパク質の分泌や糖鎖修飾を効率的に行うことができるので、リパーゼ、ラクターゼ、フィターゼなどの外来タンパク質の発現・生産に使用されている (87, 88)。加えて、遺伝子改変技術においても研究が盛んに行われており、遺伝子組み換えだけでなく、近年ではゲノム編集に関連する報告もあることから (89, 90, 91)、これらの酵母を商業生産に用いるハードルは下がりつつある。更にはトランスクリプトーム解析 (92, 93, 94)、メタボローム解析 (95, 96)、代謝フラックス解析 (97, 98, 99) に関しても研究が進められており、それぞれの酵母固有の代謝に関する理解も深まっているため、宿主としての汎用性は年々高まりつつある。それ故、近い将来これらの酵母のいずれかが *S. cerevisiae* と取って代わって商業生産のプラットフォームの中心となるかもしれない。

謝辞

本論文は、著者が大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻博士課程に在籍し行った研究結果をまとめたものです。

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科 福崎英一郎教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の審査において、貴重なご指導とご助言を賜りました大阪大学大学院情報科学研究科 清水浩教授、大阪大学大学院工学研究科 大政健史教授に厚く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、貴重なご助言を頂き、サポートして頂きました九州大学生体防御医学研究所 馬場健史教授に深く感謝申し上げます。

本研究において解糖系とペントースリン酸経路のフラックスを決定するにあたり、ご指導を賜りました大阪大学大学院情報科学研究科 松田史生教授に深く感謝申し上げます。

研究活動全般にわたりご支援を賜りました大阪大学大学院工学研究科 新聞秀一准教授、Sastia Prama PUTRI 助教に厚く御礼申し上げます。

研究活動において大変お世話になりました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物資源工学領域の皆様にご心から感謝致します。特に、分析において多大なるご協力を頂きました富尾紋子氏、新田克章氏には厚く御礼申し上げます。

本研究の開始や遂行に当たり、ご助力頂きました三菱商事株式会社 森田康裕氏、三菱商事ライフサイエンス株式会社 岩切亮博士に深く感謝致します。

最後に私の博士課程進学に際して支えてくれた家族、応援してくれた友人に深く感謝の意を表して謝辞と致します。

引用文献

1. Kim, S. J., Seo, S. O., Jin, Y. S., Seo, J. H.: Production of 2,3-butanediol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresour. Technol.*, 146, 274-281 (2013).
2. Eiteman, M. A., Altman, E.: Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations, *Trends Biotechnol.*, 24, 530-536 (2006).
3. Solem, C., Dehli, T., Jensen, P. R.: Rewiring *Lactococcus lactis* for ethanol production, *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 2512-2518 (2013).
4. Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. G.: Life with 6000 genes, *Science*, 274, 563-567 (1996).
5. Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., Rodrigues, K. F.: Yeasts in sustainable bioethanol production: A review, *Biochem. Biophys. Rep.*, 10, 52-61 (2017).
6. Nandy, S. K., Srivastava, R. K.: A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications, *Microbiol. Res.*, 207, 83-90 (2018).
7. Ibsen, K. H.: The Crabtree effect: a review, *Cancer Res.*, 21, 829-841 (1961).
8. Ata, Ö., Rebnegger, C., Tatto, N. E., Valli, M., Mairinger, T., Hann, S., Steiger, M. G., Çalık, P., Mattanovich.: A single Gal4-like transcription factor activates the Crabtree effect in *Komagataella phaffii*, *Nat. Commun.* 9, 4911 (2018).
9. Pronk, J. T., Yde Steensma. H., Van Dijken. J.P.: Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 12, 1607-1633 (1996).
10. Rozpędowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O. P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Woolfit, M., Compagno, C., Piskur, J.: Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts, *Nat.*

Commun., 2, 302 (2011).

11. Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., Compagno, C.: How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?, Trends Genet., 22, 183-186 (2006).

12. Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., Devin, A.: The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression, Biochim. Biophys. Acta., 1807, 568-576 (2011).

13. Gatt, S., Racker, E.: Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. I. Crabtree effect in reconstructed systems, J. Biol. Chem., 234, 1015-23 (1959).

14. Koobs, D.H.: Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects, Science, 178, 127-133 (1972).

15. Christen, S., Sauer, U.: Intracellular characterization of aerobic glucose metabolism in seven yeast species by ¹³C flux analysis and metabolomics, FEMS Yeast Res., 11, 263-272 (2011).

16. Entian, K. D., Fröhlich, K. U., Mecke, D.: Regulation of enzymes and isoenzymes of carbohydrate metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Biochim. Biophys. Acta., 799, 181-186 (1984).

17. Díaz-Ruiz, R., Avéret, N., Araiza, D., Pinson, B., Uribe-Carvajal, S., Devin, A., Rigoulet, M.: Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. A possible role in Crabtree effect induction?, J. Biol. Chem., 283, 26948-26955 (2008).

18. Krause-Buchholz, U., Gey, U., Wünschmann, J., Becker, S., Rödel, G.: YIL042c and YOR090c encode the kinase and phosphatase of the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex, FEBS Lett., 580, 2553-2560 (2006).

19. Roy, D. J., Dawes, I. W.: Cloning and characterization of the gene encoding lipoamide dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Gen. Microbiol., 133,

925-933 (1987).

20. Hohmann, S., Cederberg, H.: Autoregulation may control the expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes PDC1 and PDC5, *Eur. J. Biochem.*, 188, 615-621 (1990).

21. Rigoulet, M., Aguilaniu, H., Avéret, N., Bunoust, O., Camougrand, N., Grandier-Vazeille, X., Larsson, C., Pahlman, I. L., Manon, S., Gustafsson, L.: Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biochem.*, 256, 73-81(2004).

22. Eraso, P., Gancedo, J. M.: Catabolite repression in yeasts is not associated with low levels of cAMP, *Eur. J. Biochem.*, 141, 195-198 (1984).

23. Evtodienko, Yu.V., Teplova, V. V., Duszyński, J., Bogucka, K., Wojtczak, L.: The role of cytoplasmic $[Ca^{2+}]$ in glucose-induced inhibition of respiration and oxidative phosphorylation in Ehrlich ascites tumour cells: a novel mechanism of the Crabtree effect, *Cell Calcium*, 15, 439-446 (1994).

24. Heyland, J., Fu, J., Blank, L. M.: Correlation between TCA cycle flux and glucose uptake rate during respiro-fermentative growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology*, 155, 3827-3837 (2009).

25. Ye, L., Kruckeberg, A. L., Berden, J. A., van Dam, K.: Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter, *J. Bacteriol.*, 181, 4673-4675 (1999).

26. Raghevendran, V., Gombert, A. K., Christensen, B., Kötter, P., Nielsen, J.: Phenotypic characterization of glucose repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae* using experiments with ^{13}C -labelled glucose, *Yeast*, 21, 769-779 (2004).

27. Kayikci, Ö., Nielsen, J.: Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.*, 15, fov068 (2015).

28. Ahuatzi, D., Herrero, P., de la Cera, T., Moreno, F.: The glucose-regulated

nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is

Mig1-dependent, J. Biol. Chem., 279, 14440-14446 (2004).

29. Flick, K. M., Spielwoy, N., Kalashnikova, T. I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H. C., Wittenberg, C.: Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from HXT gene promoters, Mol. Biol. Cell, 14, 3230-3241 (2003)

30. Moreira dos Santos, M., Thygesen, G., Kötter, P., Olsson, L., Nielsen, J.: Aerobic physiology of redox-engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains modified in the ammonium assimilation for increased NADPH availability, FEMS Yeast Res., 4, 59-68 (2003).

31. Cordier, H., Mendes, F., Vasconcelos, I., François, J. M.: A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production, Metab. Eng., 9, 364-378 (2007).

32. Vemuri, G. N., Eiteman, M. A., McEwen, J.E., Olsson, L., Nielsen, J.: Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 104, 2402-2407 (2007).

33. Flikweert, M. T., Van Der Zanden, L., Janssen, W. M., Steensma, H. Y., Van Dijken, J. P., Pronk, J. T.: Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose, Yeast, 12, 247-257 (1996).

34. van Maris. A. J., Geertman. J. M., Vermeulen. A., Groothuizen. M. K., Winkler. A. A., Piper. M. D., van Dijken. J. P., Pronk. J. T.: Directed evolution of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*, yielding a C2-independent, glucose-tolerant, and pyruvate-hyperproducing yeast, Appl. Environ. Microbiol., 70, 159-166 (2004).

35. Moriya, H., Johnston, M.: Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I, Proc. Natl. Acad.

Sci. U. S. A., 101, 1572-1577 (2004).

36. Oud, B., Flores, C. L., Gancedo, C., Zhang, X., Trueheart, J., Daran, J. M., Pronk, J. T., van Maris, A. J.: An internal deletion in MTH1 enables growth on glucose of pyruvate-decarboxylase negative, non-fermentative *Saccharomyces cerevisiae*, Microb. Cell Fact., 11, 131 (2012).

37. Dai, Z., Huang, M., Chen, Y., Siewers, V., Nielsen, J.: Global rewiring of cellular metabolism renders *Saccharomyces cerevisiae* Crabtree negative, Nat. Commun., 9, 3059 (2019).

38. Lupiañez, J.A., Machado, A., Nuñez de Castro, I., Mayor, F.: Succinic acid production by yeasts grown under different hypoxic conditions, Mol. Cell Biochem., 3, 113-116 (1974).

39. Bakker, B. M., Bro, C., Kötter, P., Luttik, M. A., van Dijken, J. P., Pronk, J. T.: The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol., 182, 4730-4737 (2000).

40. de Smidt, O., du Preez, J. C., Albertyn, J.: Molecular and physiological aspects of alcohol dehydrogenases in the ethanol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Yeast Res., 12, 33-47 (2012).

41. Kaspar, von Meyenburg, H.: Energetics of the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae* during glucose limited aerobic growth, Arch Mikrobiol. 66, 289-303 (1969).

42. Ryan, D., Robards, K.: Metabolomics: The greatest omics of them all?, Anal. Chem., 78, 7954-7958 (2006).

43. 福崎 英一郎: メタボロミクス技術開発と精密表現型解析への応用, 生物工学, 94, 230-236 (2016).

44. Paredes-López, O., Camargo-Rubio, E., Ornelas-Vale, A.: Influence of specific growth rate on biomass yield, productivity, and composition of *Candida utilis* in

- batch and continuous culture, Appl. Environ. Microbiol., 31, 487-91 (1976).
45. Boze, H., Moulin, G., Galzy, P.: Production of food and fodder yeasts, Crit. Rev. Biotechnol., 12, 65-86 (1992).
46. Tomita, Y., Ikeo, K., Tamakawa, H., Gojobori, T., Ikushima, S.: Genome and transcriptome analysis of the food-yeast *Candida utilis*, PLoS One, 7, e37226 (2012).
47. Iwakiri, R., Eguchi, S., Noda, Y., Adachi, H., Yoda, K.: Isolation and structural analysis of efficient autonomously replicating sequences (ARSs) of the yeast *Candida utilis*, Yeast, 22, 1049-1060 (2005).
48. Iwakiri, R., Noda, Y., Adachi, H., Yoda, K.: Isolation of the YAP1 homologue of *Candida utilis* and its use as an efficient selection marker, Yeast, 22, 1079-1087 (2005).
49. Iwakiri, R., Noda, Y., Adachi, H., Yoda, K.: Isolation and characterization of promoters suitable for a multidrug-resistant marker CuYAP1 in the yeast *Candida utilis*, Yeast, 23, 23-34, (2006).
50. Hashim, Z., Teoh, S. T., Bamba, T., Fukusaki, E.: Construction of a metabolome library for transcription factor-related single gene mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 966, 83-92 (2014).
51. Tsugawa, H., Bamba, T., Shinohara, M., Nishiumi, S., Yoshida, M., Fukusaki, E.: Practical non-targeted gas chromatography/mass spectrometry-based metabolomics platform for metabolic phenotype analysis, J. Biosci. Bioeng., 112, 292-298 (2011).
52. Lommen, A.: Met align: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing, Anal. Chem., 81, 3079-3086 (2009).

53. Tsugawa, H., Tsujimoto, Y., Arita, M., Bamba, T., Fukusaki, E.: GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA), *BMC Bioinformatics*, 12, 131 (2011).
54. Tsugawa, H., Arita, M., Kanazawa, M., Ogiwara, A., Bamba, T., Fukusaki, E.: MRMPROBS: a data assessment and metabolite identification tool for large-scale multiple reaction monitoring based widely targeted metabolomics, *Anal. Chem.*, 85, 5191-5199 (2013).
55. Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., VanderGheynst, J., Fiehn, O., Arita, M.: MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis, *Nat. Methods*, 12, 523-526 (2015).
56. Morita, K., Nomura, Y., Ishii, J., Matsuda, F., Kondo, A., Shimizu, H.: Heterologous expression of bacterial phosphoenol pyruvate carboxylase and Entner-Doudoroff pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for improvement of isobutanol production, *J. Biosci. Bioeng.*, 124, 263-270 (2017).
57. Lange, H. C., Heijnen, J. J.: Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.*, 75, 334-344 (2001).
58. Leskovac, V., Trivić, S., Pericin, D.: The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.*, 2, 481-494 (2002).
59. Harden, A., Young, W. J.: The alcoholic ferment of yeast juice. Part II. The ferment of yeast-juice, *Proc. Roy. Soc. London B*, 78, 369-375 (1906)
60. Boumans, H., Grivell, L. A., Berden, J. A.: The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit, *J. Biol. Chem.*, 273, 4872-4877 (1998).

61. Luttik, M. A., Overkamp, K. M., Kötter, P., de Vries, S., van Dijken, J. P., Pronk, J. T.: The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH, *J. Biol. Chem.*, 273, 24529-24534 (1988).
62. Dawson, A. G.: Oxidation of cytosolic NADH formed during aerobic metabolism in mammalian cells, *Trends Biochem. Sci.*, 4, 171-176 (1979).
63. Larsson, C., Pålman, I. L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L., Gustafsson, L.: The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 14, 347-57 (1998).
64. Theobald, U., Mailinger, W., Baltes, M., Rizzi, M., Reuss, M.: In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae* : I. Experimental observations., *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 305-316 (1997).
65. De Vries, S., Van Witzenburg, R., Grivell, L. A., Marres, C. A.: Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.*, 203, 587-592 (1992).
66. Bakker, B. M., Bro, C., Kötter, P., Luttik, M. A., van Dijken, J. P., Pronk, J. T.: The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, 182, 4730-4737 (2000).
67. Aceituno, F. F., Orellana, M., Torres, J., Mendoza, S., Slater, A. W., Melo, F., Agosin, E.: Oxygen response of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 grown under carbon-sufficient, nitrogen-limited enological conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 8340-8452 (2012).
68. Takeda, M.: Glucose-induced inactivation of mitochondrial enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.*, 198, 281-287 (1981).
69. Nissen, T. L., Schulze, U., Nielsen, J., Villadsen, J.: Flux distributions in

anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, Microbiology, 143, 203-218 (1997).

70. Grabowska, D., Chelstowska, A.: The ALD6 gene product is indispensable for providing NADPH in yeast cells lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, J. Biol. Chem., 278, 13984 (2003)

71. Matsuda, F., Furusawa, C., Kondo, T., Ishii, J., Shimizu, H., Kondo, A.: Engineering strategy of yeast metabolism for higher alcohol production, Microb. Cell Fact., 10, 70 (2011)

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

73. Van Hoek, P., Van Dijken, J. P., Pronk, J. T.: Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast, Appl. Environ. Microbiol., 64, 4226-4233 (1998).

74. Oura, E.: Reaction-products of yeast fermentations, Process. biochem., 12, 19-21 (1977).

75. Boles, E., de Jong-Gubbels, P., Pronk, J. T.: Identification and characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme, J. Bacteriol., 180, 2875-2882 (1998).

76. Varela, C., Kutyna, D. R., Solomon, M. R., Black, C. A., Borneman, A., Henschke, P. A., Pretorius, I. S., Chambers, P. J.: Evaluation of genetic modification strategies for the development of low-alcohol-wine yeasts, Appl. Environ. Microbiol., 78, 6068-6077 (2012).

77. Walters, D., Cowley, T.: Polyamine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol, Microbiol. Res., 153, 179-184 (1998).

78. Mahmud, S. A., Hirasawa, T., Shimizu, H.: Differential importance of

trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental, J. Biosci. Bioeng., 109, 262-266 (2010).

79. Lillie, S. H., Pringle, J. R.: Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation, J. Bacteriol., 143, 1384-1394 (1980).

80. 編集部, 有機酸の市場動向, 食品と開発, 52, 53-56 (2017).

81. Date, Y., Kikuchi, J.: Application of a Deep Neural Network to Metabolomics Studies and Its Performance in Determining Important Variables, Anal. Chem. 90, 1805-1810 (2018).

82. Lian, J., Mishra, S., Zhao, H.: Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: New tools and their applications, Metab. Eng., 50, 85-108 (2018).

83. Löbs, A. K., Schwartz, C., Wheeldon, I.: Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications, Synth. Syst. Biotechnol., 2, 198-207 (2017).

84. Buerth, C., Tielker, D., Ernst, J. F.: *Candida utilis* and *Cyberlindnera (Pichia) jadinii*: yeast relatives with expanding applications, Appl. Microbiol. Biotechnol., 100, 6981-6990 (2016).

85. Löser, C., Urit, T., Stukert, A., Bley, T.: Formation of ethyl acetate from whey by *Kluyveromyces marxianus* on a pilot scale, J. Biotechnol., 163, 17-23 (2013).

86. Ledesma-Amaro, R., Nicaud, J. M.: Metabolic engineering for expanding the substrate range of *Yarrowia lipolytica*, Trends Biotechnol., 34, 798-809 (2016).

87. Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J. M., Berardi, E., Veenhuis, M., van der Klei, I.: New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica* - a comparison, FEMS Yeast Res., 5,

1079-96 (2005).

88. Spohner, S. C., Müller, H., Quitmann, H., Czermak, P.: Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*, J. Biotechnol., 202, 118-34 (2015).

89. Weninger, A., Hatzl, A. M., Schmid, C., Vogl, T., Glieder, A.: Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, J. Biotechnol., 235, 139-149 (2016).

90. Larroude, M., Rossignol, T., Nicaud, J. M., Ledesma-Amaro, R.: Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica*, Biotechnol Adv. 36, 2150-2164 (2018).

91. Löbs, A. K., Engel, R., Schwartz, C., Flores, A., Wheeldon, I.: CRISPR-Cas9-enabled genetic disruptions for understanding ethanol and ethyl acetate biosynthesis in *Kluyveromyces marxianus*, Biotechnol. Biofuels., 10, 164 (2017).

92. Shi, L., Wang, X., Wang, J., Zhang, P., Qi, F., Cai, M., Zhang, Y., Zhou, X.: Transcriptome analysis of Δ mig1 Δ mig2 mutant reveals their roles in methanol catabolism, peroxisome biogenesis and autophagy in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, Genes Genomics, 40, 399-412 (2018).

93. Wang, M., Liu, G. N., Liu, H., Zhang, L., Li, B. Z., Li, X., Liu, D., Yuan, Y. J.: Engineering global transcription to tune lipophilic properties in *Yarrowia lipolytica*, Biotechnol. Biofuels, 11, 115 (2018).

94. Mo, W., Wang, M., Zhan, R., Yu, Y., He, Y., Lu, H.: *Kluyveromyces marxianus* developing ethanol tolerance during adaptive evolution with significant improvements of multiple pathways, Biotechnol. Biofuels, 12, 63 (2019).

95. Yun, E. J., Lee, J., Kim, D. H., Kim, J., Kim, S., Jin, Y. S., Kim, K. H.: Metabolomic elucidation of the effects of media and carbon sources on fatty acid

- production by *Yarrowia lipolytica*, J. Biotechnol., 272-273, 7-13 (2018).
96. Mattanovich, M., Russmayer, H., Scharl-Hirsch, T., Puxbaum, V., Burgard, J., Mattanovich, D., Hann, S.: Metabolomics of *Pichia pastoris*: impact of buffering conditions on the kinetics and nature of metabolite loss during quenching, FEMS Yeast Res., 17, fox016 (2017).
97. Tomàs-Gamisans, M., Ødum, A. S. R., Workman, M., Ferrer, P., Albiol, J.: Glycerol metabolism of *Pichia pastoris* (*Komagataella spp.*) characterised by ¹³C-based metabolic flux analysis, N. Biotechnol., 50, 52-59 (2019).
98. Lehnen, M., Ebert, B. E., Blank, L. M.: Elevated temperatures do not trigger a conserved metabolic network response among thermotolerant yeasts, BMC Microbiol., 19, 100 (2019).
99. Liu, N., Qiao, K., Stephanopoulos, G.: ¹³C Metabolic flux analysis of acetate conversion to lipids by *Yarrowia lipolytica*, Metab. Eng., 38, 86-97 (2016).

発表論文

Imura, M., Iwakiri, R., Bamba, T., Fukusaki, E.: Metabolomics approach to reduce the Crabtree effect in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*, J Biosci Bioeng., 126, 183-188 (2018).

Imura, M., Katsuaki, N., Iwakiri, R., Matsuda, F., Shimizu, H., Fukusaki, E.: Comparison of metabolic profiles of yeasts based on the difference of the Crabtree positive and negative, J Biosci. Bioeng., in press.

特許

井村 誠、岩切 亮、福崎 英一郎、馬場 健史：サッカロミセス セレビシエの連続培養におけるエタノール生産の低減、特開 2018-019620

学会発表

1) 井村 誠、岩切 亮、馬場 健史、福崎 英一郎

“メタボロミクスに基づく *Saccharomyces cerevisiae* の連続培養におけるエタノール生産の低減”

第 68 回日本生物工学会大会、富山、2016 年 9 月

2) 井村 誠、新田 克章、岩切 亮、松田 史生、清水 浩、福崎英一郎

“クラブトリー陽性および陰性の差異に基づく酵母代謝のプロファイルの比較”

第 71 回日本生物工学会大会、岡山、2019 年 9 月

付録

別表 1 代謝物名の略号

Abbreviation	Metabolites name
2OG	2-Oxoglutarate
2PG	Glycerate 2-phosphate
3PG	Glycerate 3-phosphate
6PGA	6-Phosphogluconate
ADP	Adenosine diphosphate
α -GP	α -glycerophosphate
AMP	Adenosine monophosphate
ATP	Adenosine triphosphate
b-GP	b-glycerophosphate
1,3-BPG	1,3-Bisphosphoglycerate
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CDP	Cytidine diphosphate
CMP	Cytidine monophosphate
CTP	Cytidine triphosphate
F1P	Fructose 1-phosphate
F6P	Fructose 6-phosphate
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FBP	Fructose 1,6-bisphosphate
FMN	Flavin mononucleotide
G1P	Glucose 1-phosphate
G6P	Glucose 6-phosphate
GAP	Glyceraldehyde 3-phosphate

GDP	Guanosine diphosphate
GMP	Guanosine monophosphate
GTP	Guanosine triphosphate
HMG CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoA
IMP	Inosine monophosphate
IPP	Isopentenyl diphosphate
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphate
MEP	Methylerythritol 4-phosphate
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide ⁺
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ⁺
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PEP	Phosphoenolpyruvate
PRPP	Phosphoribosyl pyrophosphate
R1P	Ribose 1-phosphate
R5P	Ribose 5-phosphate
Ru5P	Ribulose 5-phosphate
S7P	Sedoheptulose 7-phosphate
TMP	Thymidine monophosphate
TPP	Thiamine pyrophosphate
UDP	Uridine diphosphate
UMP	Uridine monophosphate
UTP	Uridine triphosphate
XMP	Xanthosine monophosphate
Xu5P	Xylulose 5-phosphate

別表 2 第 2 章におけるローディングデータの詳細

metabolite	Loading data	
	PC1	PC2
2-Aminobutyric acid_G	-0.1426	-0.0307
2-Hydroxypyridine_G	0.0251	-0.0365
2-Isopropylmalate_L	0.0448	0.1308
2OG_L	-0.0787	0.1049
3PG_L	-0.1068	0.0389
4-Aminobutyrate_L	-0.0637	0.1354
4-Aminobutyrate_G	-0.0443	-0.0385
6PGA_L	-0.1438	0.0395
Acetyl CoA_L	-0.0646	0.1439
Adenine_L	0.1193	-0.0291
Adenine_G	0.0794	-0.0607
Adenosine_L	0.0331	0.0588
Adenosine_G	0.0745	-0.0282
ADP_L	-0.0321	0.1446
a-GP_L	0.0671	0.0773
Alanine_2TMS_G	-0.0645	0.0796
AMP_L	0.1253	0.0729
Arabitol_G	-0.1325	-0.0439
Arginine_L	-0.0256	0.1364
Asparagine_L	-0.0991	0.1113
Asparagine_G	-0.1151	0.0309

Aspartate_L	-0.0057	0.1574
Aspartate_G	-0.0070	0.1078
ATP_L	-0.1297	0.0786
b-GP_L	0.0666	0.0777
1,3-BPG_L	-0.1042	-0.0507
cAMP_L	0.1122	0.0611
CDP_L	-0.0093	0.1473
Citrate_L	0.0980	0.0917
Citrate + Isocitrate_G	0.1116	-0.0059
Citrulline_G	-0.0518	0.0729
CMP_L	0.0962	0.0650
CoA_L	0.0687	0.1007
CTP_L	-0.1473	-0.0010
Cysteine_L	0.0498	-0.0836
Cytidine_L	0.1455	0.0608
F1P_L	0.0970	0.1000
F6P_L	-0.0112	0.1523
FAD_L	-0.0573	0.1282
FBP_L	0.0144	0.0348
FMN_L	-0.0645	-0.0134
Fumarate_L	-0.1062	0.0480
Fumarate_G	-0.1207	-0.0272
G1P_L	0.0590	-0.0141
G6P_L	0.0375	0.1354

GDP_L	0.0784	0.1171
Glucose_G	0.0599	-0.0806
Glutamate_L	-0.0321	0.1547
Glutamate_G	-0.1113	0.0089
Glutamine_L	-0.0205	0.1702
Glutamine_3TMS_G	-0.0629	0.0620
Glutathione_L	-0.0708	0.1172
Glycine_3TMS_G	-0.0377	0.0464
Glyoxylate_L	-0.0280	0.1415
GMP_L	0.1190	0.0760
GTP_L	-0.1479	0.0079
Guanine_L	-0.0087	-0.0068
Guanosine_L	0.1071	0.0900
Histidine_L	-0.0832	-0.0504
HMG CoA_L	-0.0465	0.0685
homoserine_G	0.0746	0.0529
IMP_L	0.0481	0.0709
Inositol_G	-0.1227	-0.0366
IPP,DMAPP_L	-0.0634	0.1338
Isocitrate_L	0.0921	0.0744
Isoleucine_L	0.1305	0.0141
Isoleucine_2TMS_G	0.0611	0.0942
Lactate_L	0.0152	0.1524
Laurate_G	0.0491	0.0324

Leucine_L	-0.0585	-0.1358
Lysine_L	-0.0252	0.1690
Lysine_4TMS_G	-0.1058	-0.0705
Lyxose_G	-0.1472	-0.0076
Malate_G	-0.1297	-0.0086
Malonyl CoA_L	-0.1092	0.0470
MEP_L	-0.0537	0.1316
Methionine_L	-0.0780	-0.0413
Methionine_G	-0.0650	-0.0657
N-Acetyl-L-Glutamate_G	0.0072	-0.0734
NAD_L	-0.0437	0.1547
NADH_L	-0.0464	0.1187
NADP_L	-0.0409	0.1577
NADPH_L	0.0587	0.1498
Nicotinate_L	0.1130	0.0603
n-Propylamine_G	-0.0770	0.0011
Ornithine_G	0.0246	0.0136
Oxalate_G	-0.0365	-0.0452
Pantothenate_L	0.0357	0.0964
PEP_L	-0.1260	0.0283
Phenylalanine_L	-0.0077	0.0703
Phenylalanine_G	-0.0648	-0.0191
Phosphate_G	0.1325	0.0749
Proline_L	-0.0901	0.1380

Proline_G	-0.1243	0.0333
PRPP_L	-0.0978	-0.0149
Putrescine_G	0.0176	0.0014
Pyridoxamine-5P_L	0.1122	0.0527
Pyroglutamate_G	-0.0980	0.0818
Pyruvate_L	0.0396	0.1435
Pyruvate+Oxalacetate_G	0.0553	0.0717
R1P_L	-0.0376	0.0951
R5P_L	-0.0077	0.0945
Ru5P_L	-0.1082	0.0852
S7P_L	0.0553	-0.0190
Serine_L	-0.0505	0.1547
Serine_2TMS_G	-0.1217	0.0079
Serine_3TMS_G	-0.1353	0.0237
Shikimate-3P_L	0.0542	0.1422
Shikimate_G	0.0077	-0.0745
Succinate_L	-0.1426	0.0220
Succinate_G	-0.1404	-0.0590
Threonine_L	-0.0392	0.1596
Threonine_2TMS_G	-0.0857	0.0450
Threonine_3TMS_G	-0.0958	0.0684
TMP_L	0.1129	0.0492
TPP_L	0.1184	-0.0735
Trehalose_L	0.0424	0.1390

Trehalose_G	0.0167	0.0646
Tryptophan_L	-0.1529	0.0349
Tryptophan_G	-0.1514	-0.0002
Tyrosine_L	-0.1454	-0.0213
Tyrosine_G	-0.1463	-0.0443
UDP_L	0.0462	0.0876
UMP_L	0.1152	0.0552
Uridine_L	0.1495	0.0299
UTP_L	-0.1410	-0.0455
Valine_L	-0.0219	0.1680
Valine_2TMS_G	-0.0593	0.1164
XMP_L	-0.0855	0.0588

末尾に_L と記載された場合は LC-MS/MS によって同定された代謝物、_G と記載された代謝物は GC-MS によって同定された代謝物である。

別表 3 第 3 章におけるローディングデータの詳細

metabolite	Loading data	
	PC1	PC2
n-Propylamine	0.014	0.104
2-Hydroxypyridine	0.029	-0.056
Pyruvate+Oxalacetic acid	-0.073	-0.097
Lactic acid	0.018	-0.053
Alanine	0.158	0.255
n-Butylamine	0.021	0.042

2-Aminoisobutyrate	-0.002	-0.047
2-Aminobutyric acid	0.126	0.128
Valine	0.229	0.022
Urea	0.049	-0.138
2-Aminoethanol	0.091	-0.147
Glycerol	-0.251	0.056
Leucine	0.109	0.189
Isoleucine	0.123	0.086
Proline	0.182	-0.218
Glycine	-0.086	0.271
Succinic acid(or aldehyde)	-0.059	0.332
Fumaric acid	0.150	0.153
Serine	-0.157	0.095
Threonine	-0.119	0.092
Glutaric acid	0.190	0.284
b-Alanine	-0.047	0.076
homoserine	-0.124	0.003
Malic acid	0.202	0.256
Aspartic acid	-0.140	-0.198
Methionine	-0.111	0.121
Pyroglutamic acid	-0.103	0.174
4-Aminobutyric acid	-0.041	0.162
Glutamic acid	0.051	0.247
Phenylalanine	0.109	0.045

Asparagine	0.189	-0.082
Glutamine	0.060	-0.131
Shikimic acid	-0.007	0.051
Citric acid + Isocitric acid	-0.051	-0.068
Ornithine	-0.213	0.155
Citrulline	-0.085	-0.048
4-Aminobenzoic acid	0.224	0.040
Allose	-0.067	-0.039
Adenine	-0.089	-0.170
Lysine	-0.012	-0.093
Histidine	-0.087	-0.177
Sorbitol	-0.091	-0.170
Tyrosine	0.164	-0.091
N-a-Acetyl-L-Ornithine	-0.237	0.076
Inositol	-0.075	0.022
Tryptophan	0.116	-0.115
Octadecanoate	-0.004	-0.025
Fructose 6-Phosphate	0.215	0.036
Trehalose	0.468	-0.124
