

Title	酵素反応測定と代謝フラックス解析に基づく代謝経路の律速反応の推定に関する研究
Author(s)	戸谷, さや香
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/85273
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

酵素反応測定と代謝フラックス解析に基づく
代謝経路の律速反応の推定に関する研究

提出先 大阪大学大学院情報科学研究科

提出年月 2021 年 3 月

戸 谷（北 村） さ や 香

学位取得に関連する発表論文

学術雑誌

- [1] **Sayaka Kitamura**, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu, “¹³C-Metabolic Flux Analysis Reveals Effect of Phenol on Central Carbon Metabolism in *Escherichia coli*” *Front Microbiol.* 2019;10:1010. Published 2019 May 7. (博士論文第 3 章)
- [2] **Sayaka Kitamura**, Hiroshi Shimizu, Yoshihiro Toya, “Identification of a rate-limiting step in a metabolic pathway using the kinetic model and *in vitro* experiment”, *J Biosci Bioeng.* 2021 Mar; 131(3):271-276. (博士論文第 2 章)

国際会議

- [1] **Sayaka Kitamura**, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu, “High-throughput measurement method for multiple enzyme specific activities using a kinetic model”, 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCChE 2019), PL303, Sapporo, Japan, September 25, 2019. (博士論文第 2 章)

内容梗概

微生物の代謝を利用した様々な有用物質の生産が行われているが、その生産収率は低いものが多く、代謝経路における反応速度 (フラックス) を調べることにより、収率向上のための代謝の改変が行われてきた。収率だけでなく生産速度の向上も重要な課題であり、原料から目的産物への生産速度の向上のために律速反応を同定して、その反応を強化することが求められている。これまで代謝状態の評価には ^{13}C 代謝フラックス解析が利用されてきた。しかし、 ^{13}C 代謝フラックス解析だけでは、解糖系のように複数の連続した反応からなる直線経路内の律速反応は同定できない。このような直線経路内の律速反応を同定するには、経路内の全反応の最大反応速度 (V_{\max}) を求め、そのうちの最小の V_{\max} をもつ反応を律速反応として特定することが有効と考えられる。 V_{\max} は反応を触媒する酵素の発現量の影響を受けるため、菌株や培養条件によって異なる。そのため、目的の細胞の代謝経路の律速反応を調べるには、その細胞の環境条件における代謝経路の全ての反応の V_{\max} を取得する必要がある。しかし、従来の V_{\max} 測定方法では、酵素ごとに異なる実験方法で測定するため、多数の酵素反応の V_{\max} を一度に測定することは困難であった。そこで、本研究では、新たに反応速度論モデルを利用した粗酵素抽出液による *in vitro* 酵素反応測定を用いた複数酵素の V_{\max} の同時推定法によって、直線経路内の最小の V_{\max} をもつ反応を特定し、律速反応を同定する手法を開発した。

本研究では、代謝経路の形状で場合分けすることで、直線や分岐を含む代謝経路の律速反応を同定するための方法論を提案した。まず、分岐を含む代謝経路について ^{13}C 代謝フラックス解析と *in vitro* 酵素反応測定の結果から、分岐箇所が存在する律速反応を同定した。次に、直線経路の全反応の V_{\max} の同時推定によって最小の V_{\max} を特定することにより、律速反応を同定した。

本学位論文は、第1章から第4章より構成される。第1章では、研究の背景と目的を述べた。第2章では、反応速度論モデルと *in vitro* 酵素反応測定を用いて、直線経路内の複数酵素の V_{\max} 同時推定による律速反応の同定手法を開発した。第3章では、 ^{13}C 代謝フラックス解析および *in vitro* 酵素反応測定、第2章の直線経路の律速反応同定手法を用いて、大腸菌に有害なフェノール存在時の大腸菌の分岐を含む中心炭素代謝経路において、クエン酸シンターゼが律速反応であると突き止めた。第4章では、本提案手法の性能や適応範囲、今後の発展に必要な課題を議論し、代謝経路の律速反応の同定に対する本研究の寄与と今後の展望を述べた。

目次

第1章 緒論.....	3
1.1 研究の背景.....	3
1.1.1 生物工学における微生物代謝の研究.....	3
1.1.2 大腸菌の中心炭素代謝経路.....	6
1.1.3 細胞内代謝を評価するための解析技術.....	8
1.1.3.1 オミックス解析.....	8
1.1.3.2 ¹³ C 代謝フラックス解析.....	9
1.1.3.3 <i>in vitro</i> 酵素反応測定.....	11
1.1.3.4 代謝経路の反応速度論モデル.....	12
1.1.4 代謝経路における律速反応の同定とその課題.....	14
1.2 本論文の目的および構成.....	17
第2章 反応速度論モデルと <i>in vitro</i> 酵素反応測定を用いた律速反応同定法の開発	19
2.1 緒言.....	19
2.2 手法と材料.....	22
2.2.1 対象とした代謝経路.....	22
2.2.2 使用した反応速度論モデル.....	22
2.2.3 仮想実験.....	23
2.2.4 複数酵素の V_{\max} の同時推定による律速反応の同定方法.....	23
2.2.5 使用菌株.....	24
2.2.6 菌体取得とその培養条件.....	24
2.2.7 粗酵素抽出液の調製とタンパク質濃度定量.....	25
2.2.8 実際の大腸菌の粗酵素抽出液を用いた <i>in vitro</i> 代謝経路解析.....	25
2.2.8.1 反応液組成と反応条件.....	25
2.2.8.2 NADH 濃度の測定.....	26
2.2.8.3 時系列サンプリング方法.....	27
2.2.8.4 代謝物質濃度の測定.....	27
2.2.9 律速反応酵素の添加実験による律速反応同定結果の検証 (<i>in vitro</i>).....	30
2.2.10 定常期培養による律速反応同定結果の検証 (<i>in vivo</i>).....	31
2.2.11 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動.....	32
2.3 結果.....	33
2.3.1 仮想実験データによる複数酵素の V_{\max} の同時推定からの律速反応の同定.....	33
2.3.2 実際の大腸菌の粗酵素抽出液を用いた <i>in vitro</i> 代謝経路解析結果.....	38

2.3.3	実際の大腸菌粗酵素抽出液を用いた <i>in vitro</i> 代謝経路解析による律速反応の同定.....	40
2.3.4	律速反応酵素の添加実験による律速反応同定結果の検証 (<i>in vitro</i>).....	42
2.3.5	定常期培養による律速反応同定結果の検証 (<i>in vivo</i>).....	43
2.5	結言.....	50
第3章	¹³ C 代謝フラックス解析と <i>in vitro</i> 酵素反応測定および <i>in vitro</i> 代謝経路解析による律速反応の同定.....	52
3.1	緒言.....	52
3.2	手法と材料.....	53
3.2.1	使用した大腸菌株.....	53
3.2.2	培養条件.....	54
3.2.3	菌体濁度の測定と培養液上清の分析.....	54
3.2.4	GC/MS によるタンパク質由来アミノ酸の質量分析.....	55
3.2.5	¹³ C 代謝フラックス解析.....	56
3.2.6	粗酵素抽出液の調製とタンパク質濃度定量.....	57
3.2.7	従来法の <i>in vitro</i> 酵素反応測定.....	58
3.2.8	フェノール添加条件における代謝変動の観察のための <i>in vitro</i> 代謝経路解析.....	59
3.2.9	代謝変動の観察のための律速反応の同定手法の適用.....	60
3.3	結果.....	61
3.3.1	大腸菌の細胞増殖に対してフェノールが及ぼす影響の評価.....	61
3.3.2	代謝フラックス分布の推定結果.....	64
3.3.3	フェノールが酵素の活性に及ぼす影響と律速反応.....	68
3.3.4	大腸菌野生株のフェノールの添加有無による <i>in vitro</i> 代謝経路解析.....	72
3.3.5	<i>in vitro</i> 代謝経路解析からの律速反応同定によるフェノール添加時の代謝変動の観察.....	74
3.4	考察.....	76
3.5	結言.....	81
第4章	結論と展望.....	83
4.1	結果のまとめ.....	83
4.2	微生物の代謝経路の律速反応の同定に対する本研究の寄与と今後の展望....	85
	参考文献.....	88
	付録.....	100
	謝辞.....	130

第 1 章 緒論

1.1 研究の背景

1.1.1 生物工学における微生物代謝の研究

古来より微生物の発酵によって、チーズ、ヨーグルト、パン、味噌、醤油、酒類などの様々な食品が生み出されてきた。人類は、微生物がどのようにおいしく付加価値の高い物質を作り出せるのかは分からないまま、偶然の産物を享受することで生活を豊かにしてきた。生物工学の発展によって、生物の仕組みや働き、機能を解明し、それを工学として活用することで、よりおいしい食品を作ることができ、利用価値が高い有益な物質を多く生産できるようになった。近年では、化石燃料の枯渇が懸念され、二酸化炭素排出削減の取り組みが加速する中で、微生物の代謝を利用した再生可能資源であるバイオマスを原料とする環境に配慮した有用化学物質や燃料資源の生産が注目されている。

細胞はグルコースなどの糖を、多段階の酵素反応を経て様々な低分子化合物へと分解する。また、その過程で細胞増殖に必要なエネルギーや還元力を獲得し、これらを駆動力として自身を再構成するための高分子化合物を生合成する。この多段階の反応は、細胞がエネルギーや還元力の細胞内における収支がつりあうように、複数の反応が関連しながらネットワークを構成している。この一連の反応ネットワークを代謝と呼ぶ。代謝経路のほとんどの反応は、酵素が触媒として働くことで進行している。分子生物学の技術が飛躍的に進歩し、異種遺伝子の導入や内在遺伝子の欠失を効率的に行えるようになり、組換え DNA 技術が一般的な研究手段となった。この分子生物学の技術の進展によって、異種遺伝子の導入などの手段で強化したい反応を触媒する酵素の発現量を増加させることが可能となり、目的の反応を強化して代謝を合理的に改変する代謝工学のアプローチが強力な手段となっている。

代謝工学とは、1990 年代初頭に Bailey (Bailey, 1991) や Stephanopoulos ら (Stephanopoulos and Vallino, 1991) によって提唱された学問である。代謝工学では、利用可能な代謝反応の情報を用いて、生化学反応ネットワークを解析することにより、ある物質の生産を増加させたいという目的に応じて、代謝経路のフラックスの分布を体系的に改良することを目的とする。フラックスは、単位時間、乾燥菌体重量 (gDCW; gram dry-cell weight) あたりの反応速度 (mmol/gDCW/h) として定義される。代謝経路のフラックス分布の体系的な改良とは、例えば、その対象生物の代謝経路の一部の反応の反応速度 (フラックス) を増加させたり、また他の部分の反応のフラックスを減少させたりすることで、代謝経路内で調節をとりながら、経路全体のフラックス分布を改良することである。

代謝工学のアプローチが工学分野で研究され始めて以来、様々な生物種や目的化合物を対象として、代謝工学を用いた数多くの成功例が生み出されてきた (Arense *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015; Harder *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2018;

Huccetogullari *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2019)。さらに、ゲノム編集の技術が登場し、より自在に生物の遺伝情報を操作できるようになった現在、目的の細胞の形質を実現するために、一部の反応経路を異種生物からの導入することや宿主生物に内在する使われていない反応を削除することを含めて、代謝経路全体を経由した最終目的物質の生産速度をどのように改変すればよいのか、代謝工学に基づく合理的な取り組みの重要性が増してきている。

代謝工学においては、目的化合物の生産に理想的な代謝状態を現実の細胞で実現するため、「設計」と「評価」という二つの側面から研究が進められている (Liu and Nielsen, 2019)。すなわち、目的の形質が得られるように、先行研究の情報をもとに代謝システムを設計し、それが現実の細胞において設計通り働いているのかを評価する。設計通り働いていない場合は、評価に基づいて原因を明らかにし、その知見を設計に反映させるというサイクルを回すことで、効率的な育種を実現する (Opgenorth *et al.*, 2019; Vavricka *et al.*, 2020)。代謝システムの設計においては、数理モデルを利用したシミュレーションに基づいて、設計した代謝システムが細胞内でどのように働くのかを予測する手法が開発されている (Hamedirad *et al.*, 2019; Vavricka *et al.*, 2020)。次世代シーケンサの登場によって全ゲノム配列が容易に解読できるようになり、細胞が有する酵素の情報を網羅的に取得することが可能になったため、これらの知見に基づいて数理モデルを構築し、宿主の微生物種や外来遺伝子の導入、内在遺伝子の欠失が、目的物質の生産効率に及ぼす影響を予測することができる。

反応の化学量論や物質収支に基づくフラックスバランス解析は、代謝工学における代謝改変のための基盤技術として広く使われており (Orth *et al.*, 2010)、副産物の合成を遮断するなど、目的物質の収率を向上させる上で威力を発揮している (Miklóssy *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2017; Tokuyama *et al.*, 2019b)。一方で、フラックスバランス解析に基づく代謝システムの設計手法だけでは、目的物質の生産速度を向上させることは難しい場合もある (Tokuyama *et al.*, 2018)。この原因の1つは、フラックスバランス解析では、化学量論や物質収支は考慮しているが、代謝物質の濃度や反応速度論を考慮していないことであると言える。定常状態における代謝経路の反応速度は、一連の代謝経路に含まれる反応の中での最も遅い反応によって制限される。また、反応経路内の最も遅い反応は、その最大反応速 (V_{\max}) も反応経路内で最小である。微生物の代謝を用いた効率的な有用物質生産において、特に直線状の代謝経路内では V_{\max} が最小となって律速反応であった反応を強化し、目的物質の生産速度を増大させることを目指す (図 1-1)。よって、この前提において本研究では代謝経路における律速反応は、経路内で最小の V_{\max} をもち、その反応を強化させる対象となるものであることとする。

経路全体のフラックスを上昇させるには、律速反応を同定して、その酵素の発現量を増やして反応を強化することが重要である (Emmerling *et al.*, 1999; Pitera *et al.*, 2007; Takemura *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013; Andreatti *et al.*, 2016; Hara *et al.*, 2019)。そのため、一連の代謝経路の中からどの反応が律速反応となっているかを予測する技術が強く求

められている。

代謝経路は複数の連続する反応によって成り立っており、その中には解糖系のように一本道の連続した経路や同じ基質から異なる酵素によって別々の生成物に変換される分岐箇所が含まれている。図 1-1 に分岐のない代謝経路における律速反応と律速反応解除の効果をも、図 1-2 に分岐のある代謝経路における律速反応の例を示した。図 1-1 では分岐のない一本道の連続した直線状の経路において律速となる反応を特定し、その反応を触媒する酵素の発現量を増やすことで、律速反応となっていた反応を強化すれば、生産速度が増大し、目的物質の生産量を増やすことができる。

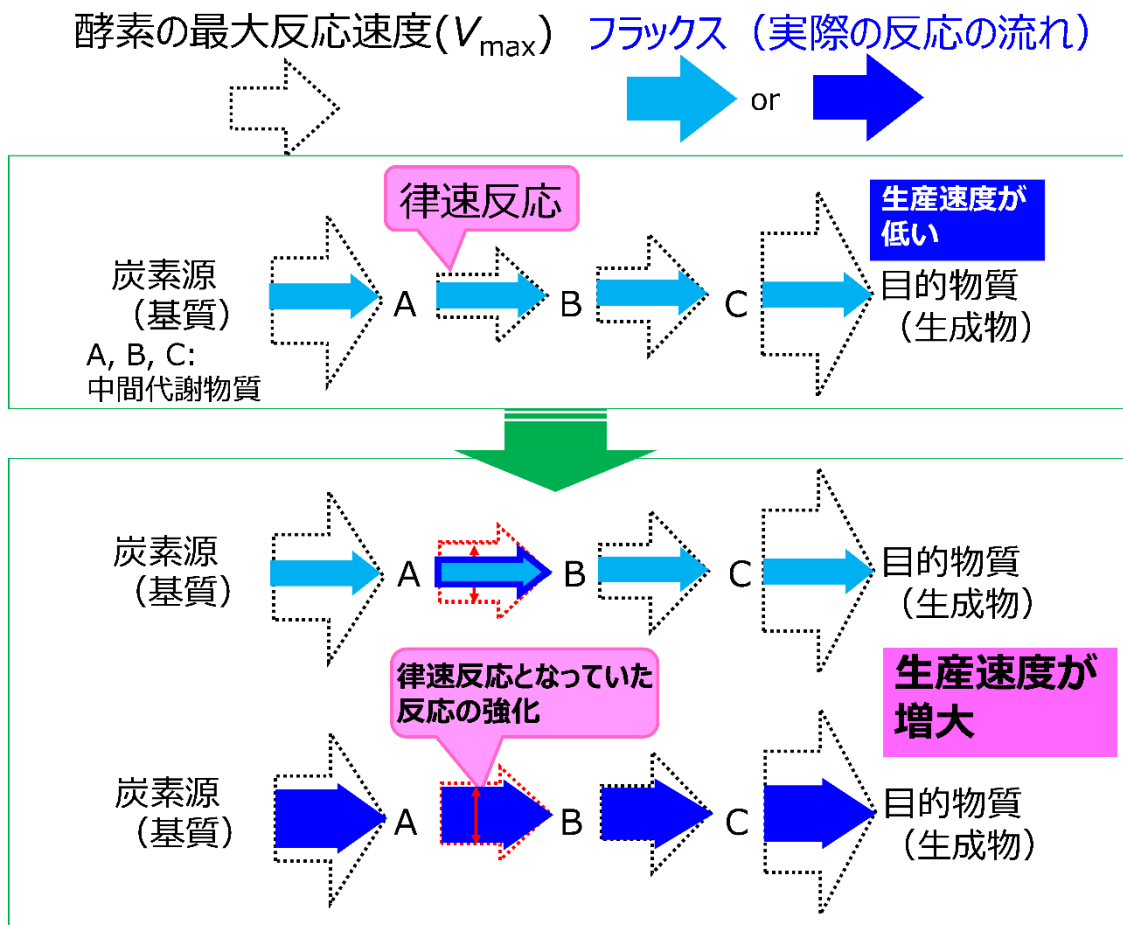


図 1-1 分岐のない代謝経路における律速反応の例と
律速反応となっていた反応の強化の効果

基質から中間代謝物質 A、B、C を経て目的物質が生産される直線の代謝経路において、経路全体の反応速度は反応速度が一番遅い律速反応 (この例では A から B への反応) によって制限される (図上段)。この律速反応となっていた反応を触媒する酵素の発現量を増加させることで、経路全体のフラックスを増大させることができる (図下段)。

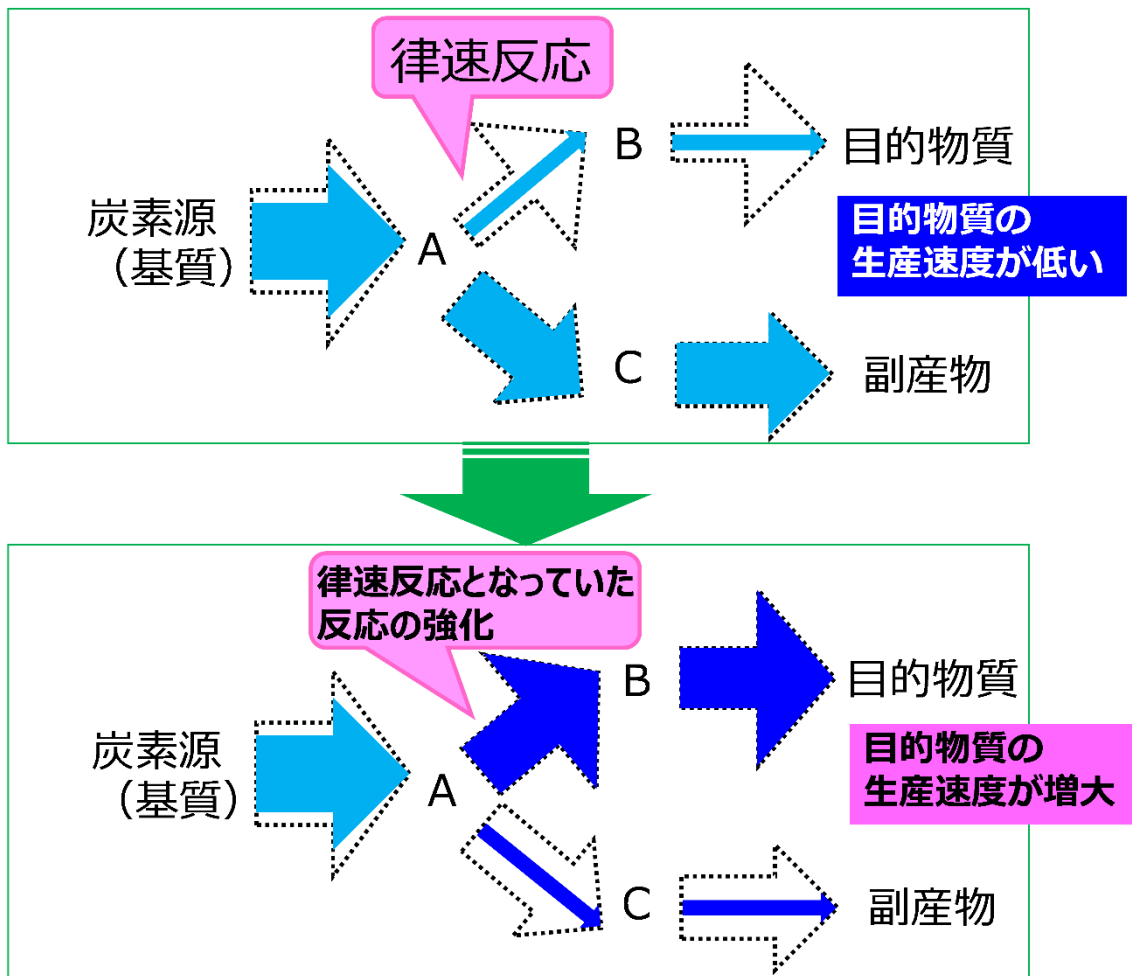


図 1-2 分岐のある代謝経路における律速反応の例と
律速反応となっていた反応の強化の効果

分岐箇所には律速反応がある場合、分岐箇所を起点にフラックス分布が変化する。この例では、中間代謝物質 B から合成される目的物質よりも、C から合成される副産物のへのフラックスが大きい。分岐箇所の A から B への反応が律速反応の場合、この反応を触媒する酵素の発現量を増やすことで反応を強化し、目的物質の生産速度を増大させることができる。

1.1.2 大腸菌の中心炭素代謝経路

工業的な物質生産の宿主としては、大腸菌、酵母、コリネ型細菌などが利用されている (Chen *et al.*, 2013; Julleson *et al.*, 2015; Becker *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019)。本研究では、原核細胞生物のモデル生物であり、代謝についての知見の蓄積も多い、大腸菌を研究の対象とする。また、中心炭素代謝経路は、グルコースを分解してアミノ酸や核酸など細胞構成部品の前駆体をつくる代謝経路の主要な反応経路であり、解糖系、ペントースリン酸経路、クエン酸 (TCA) 回路などが含まれる。微生物の代謝工学を用いた物質生産において、目的物質とされる多くの有用化合物が、中心炭素代謝経路における中間

代謝物質を出発物質として合成されるため (Lehnen *et al.*, 2017; Edirisinghe *et al.*, 2018)、中心炭素代謝経路の流れを強化することは様々な目的物質の生産において重要である。

中心炭素代謝経路の上流の解糖系は 10 個の連続した酵素反応からなる直鎖の代謝経路であり、細胞に取り込まれたグルコース (Glc) をピルビン酸 (PYR) に変換し、TCA 回路に受け渡す役割を担う。大腸菌はグルコースの取り込みを調節するため、解糖系に様々な調節機構を備えている。例えば、解糖系の上流のホスホフルクトキナーゼ (PFK) は、解糖系の下流の代謝物質のホスホエノールピルビン酸 (PEP) やエネルギー物質の ATP が結合すると PFK の構造が変化し、活性反応が低下することが知られている (Goldbeter, 2013)。この PFK の阻害機構は、フィードバック制御として大腸菌の解糖系の反応速度の調節に寄与している。また、解糖系上流の代謝物質のフルクトース 1,6 ビスリン酸 (FBP) の細胞内における蓄積は、FBP アルドラーゼ (FBA) の反応において解糖系のフラックスに影響を及ぼす転写因子 Cra の活性を抑制し、TCA 回路などの下流の経路の酵素の遺伝子発現を制御することも知られている (Kochanowski *et al.*, 2013)。

大腸菌におけるフラックス制御機構は、他にもカタボライト抑制 (Park *et al.*, 2006) または活性化タンパク質の Cra や環状アデノシン 1 リン酸 (AMP) の受容体タンパク質である転写因子 Crp による転写調節に関連したカタボライト抑制機構などが存在する。Crp は広く炭素代謝の開始を制御し、Cra はより広範囲の代謝経路のフラックスの制御を行うことが知られている。環状 AMP と複合体となった Crp は、大腸菌がグルコースやキシロース、グリセロールなどの様々な炭素源の違いを感知して炭素源として利用できるように、炭素源ごとの代謝の開始における遺伝子の活性化因子として働いている (Zhang *et al.*, 2014)。また、アミノ酸などの栄養源の枯渇を検知して、シグナル伝達分子の ppGpp を介して選択的に各遺伝子の遺伝子発現量を増加または減少させて制御することで、細胞増殖を抑制するストレス応答時のフラックスの調節機構が大腸菌で存在することが知られている (Roberts, 2009; Roghanian *et al.*, 2019; Brandi *et al.*, 2020)。

このように分子レベルにおいて、大腸菌の中心炭素代謝経路の酵素反応がどのように相互作用の影響を受けているのかということは、これまでによく調べられてきた (Matsuoka and Shimizu, 2011)。また、解糖系の代謝酵素が複数の役割をもって細胞内で働いているということも調べられてきた (Kim and Dang, 2005)。一方で、相互に作用している代謝経路の酵素反応では、それぞれの反応速度は、個々の酵素反応ごとに、酵素量、酵素の回転数、基質や生成物の濃度、速度定数の影響を受けている。このことは、中心炭素代謝経路だけではなく、代謝経路一般において成立する。さらに、細胞内の酵素量は外的環境要因の培養条件によっても変化するため、律速反応となる反応は、培養条件ごとに異なる可能性がある。ゆえに、ある培養条件の細胞において一連の代謝経路の中で、いったいどの反応が律速反応になっているのかという問題には、簡単には答えることができない。

1.1.3 細胞内代謝を評価するための解析技術

代謝経路における反応速度は、酵素量や代謝物質の濃度の影響を受けることを前節で述べた。近年、細胞内の酵素や代謝物質の濃度、反応速度を測定するための技術が開発され、細胞の代謝状態を評価する研究が盛んに行われている (Gracia-Albornoz *et al.*, 2014; Chong *et al.*, 2018; Chong *et al.*, 2019)。これらの研究において、代謝経路の調節メカニズムを解明する取り組みも報告されている (Sauro, 2017)。本節では、これらの解析技術の現状と、これらの解析を用いて代謝経路の律速反応を予測する上での課題について述べる。

1.1.3.1 オミックス解析

細胞内には、代謝反応に関わる酵素や低分子化合物が多数存在する。分析技術の発展により、これらを網羅的に測定する取り組みが行われるようになってきた。細胞内の低分子化合物の全体をメタボローム (Gracia-Albornoz *et al.*, 2014; Chong *et al.*, 2018; Wishart *et al.*, 2018; Chong *et al.*, 2019)、酵素を含むタンパク質の全体をプロテオーム (Han and Lee, 2006; Aslam *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2019; Altelaar *et al.*, 2013) と呼ぶ。これらメタボロームやプロテオームなどを解析する技術を総称してオミックス解析という。

メタボローム解析では質量分析計を利用することで、細胞内に含まれる数千の代謝物質を定量することが可能になっている。大腸菌では、中心炭素代謝経路に関わる酵素の遺伝子を欠失した変異株を対象としたメタボローム解析によって、代謝経路の遮断による中間代謝物質の蓄積に及ぼす影響が明らかにされている (Ishii *et al.*, 2007)。Ohtake らの 1-butanol 生産大腸菌株のメタボローム解析では、1-butanol 生合成経路に関与する CoA 化合物の蓄積についての知見から、対象とする代謝経路の律速反応を同定できたことが報告されている (Ohtake *et al.*, 2017)。

メタボローム解析によって、代謝物質である各酵素の基質と生成物の濃度を調べることができ、基質と生成物の濃度の関係から、反応における Gibbs 自由エネルギー変化を調べることができる (Park *et al.*, 2016)。この Gibbs 自由エネルギー変化の知見は、代謝経路のどの反応がエネルギー的に進行しにくいかを明らかにする手がかりとなり、律速反応を予測するための指標として使われている。Nagai らは大腸菌のメバロン酸生産株について、Gibbs 自由エネルギー変化を指標として律速反応を予測し、予測に基づいて代謝改変を行うことによって、メバロン酸の生産速度向上に成功した (Nagai *et al.*, 2018)。一方で、代謝物質の蓄積が反応のフラックスにどれくらい影響するのかは、酵素と代謝物質の親和定数に依存する。また、触媒となる酵素自身の量や性能も反応速度に影響する。そのため、メタボローム解析からの情報だけでは、代謝経路の律速反応を定量的に予測することは難しい。

また、細胞内のタンパク質を定量するための手段としては、プロテオーム解析が研究されている。二次元電気泳動や質量分析計を利用した手法により、大腸菌の中心炭素代謝経路に関わる酵素の存在量を網羅的に調べることが可能になっている (Peng and

Shimizu, 2003)。プロテオーム解析によって発現量が増加した酵素を特定することができる。そして、発現量が増加した酵素に焦点を当てて、酵素の発現量増加などの改変を行うことで、代謝経路で律速反応となっていた反応を強化することを目指した研究が行われている。Lee らはポリ 3 ヒドロキシブチレート生産大腸菌株のプロテオームを解析し、TpiA と FbaA がポリ 3 ヒドロキシブチレートの生産時に増加していることに着目し、これらの酵素の過剰発現により生産性が増加したことを報告している (Lee *et al.*, 2013)。このように、酵素の発現量を網羅的に調べるプロテオーム解析のデータは、各酵素の触媒能力を示す指標となる。しかし、酵素の活性を示す最大反応速度 (V_{\max}) を議論するには、酵素の発現量に加えて、酵素の回転数を考慮する必要がある。酵素の回転数は、単位時間あたりに酵素が何回反応を触媒できるかを表わすパラメータであり、酵素の含量が多くても、回転数が小さい酵素の触媒活性は低く、含量が少なくても回転数が大きい酵素の触媒活性は高い。よって、酵素の活性 V_{\max} は酵素量に回転数をかけることで評価すればよい。しかしながら、多くの酵素では、回転数の正確な値は分かっていないため、このプロテオーム解析による網羅的な酵素の発現量データからの酵素ごとの V_{\max} の比較は難しい。また、酵素やタンパク質は翻訳後にリン酸化などの共有結合修飾を受けて代謝の調節を担うことが多い。翻訳後修飾を受けると酵素の活性が変化し、 V_{\max} の数値も変動することがあるため、プロテオーム解析による酵素の発現量の数値データによって酵素の V_{\max} を直接評価することは難しい。

1.1.3.2 ^{13}C 代謝フラックス解析

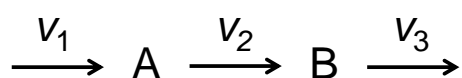
上記のオミックス解析が代謝に関わる細胞内の基質や生成物の低分子化合物、タンパク質などの構成部品の存在量を測定する技術であるのに対して、代謝経路における反応速度を調べる代謝フラックス解析も代謝工学に広く利用されている (Toya and Shimizu, 2013)。代謝フラックス解析の解析対象は、反応速度であり、反応速度はオミックス解析が対象とする低分子化合物やタンパク質と異なり、実体のない対象であるため、細胞から反応速度を取り出して直接計測することができない。そのため、細胞内の物質の濃度が一定状態を保っている定常状態における物質収支を仮定することで、測定可能な基質の消費速度や代謝産物の排出速度、細胞の再構成の速度を示す細胞の増殖速度から、細胞内の代謝経路の内部のフラックス分布を推定する (Crown and Antoniewicz, 2013)。一般に、多くの代謝経路は分岐や合流、回路を含むため、流入と流出のフラックスだけでは、経路内部のフラックスを一意に決定することができない。そのため、安定同位体で標識された基質を利用した ^{13}C 代謝フラックス解析が利用されている (Wiechert, 2001; Leighty and Antoniewicz 2012)。この ^{13}C 代謝フラックス解析では、 ^{13}C 安定同位体を含む炭素源を利用して細胞を培養する。細胞に取り込まれた炭素源は、代謝経路内の様々な反応を経由して代謝される。反応ごとに骨格炭素原子の変化が異なるため、フラックス分布の情報は代謝物質の標識パターンに記録される。そこで、代謝物質の標識パターンを質量分析計によって測定し、実測データを説明するようなフラックス分布を代謝経路

のモデルに合わせて推定する。 ^{13}C 代謝フラックス解析は、タンパク質由来のアミノ酸の標識パターンを利用して解析が行われてきた(Wittmann 2007; Zamboni *et al.*, 2009; Crown and Antoniewicz, 2013)。

これまで様々な大腸菌を宿主とする有用物質の生産株について、 ^{13}C 代謝フラックス解析が実施されてきた。Okahashi らは大腸菌のイソプロピルアルコール生産株について解析を実施し、増殖期においてイソプロピルアルコールの生合成に必要な還元力の NADPH が不足することを明らかにした。さらに、 ^{13}C 代謝フラックス解析によって得られたフラックス分布を指標に、イソプロピルアルコール生産株の増殖停止期に酸化的ペントースリン酸経路や TCA 回路で NADPH を産生させて、高いイソプロピルアルコールの生産収率を実現した (Okahashi *et al.*, 2017)。He らも、大腸菌の脂肪酸生産株における酸化的ペントースリン酸経路の寄与について ^{13}C 代謝フラックス解析を使って明らかにした。その結果得られた知見から、酸化的ペントースリン酸経路を触媒する酵素の発現量を強化することで脂肪酸生産収率の向上を実現した (He *et al.*, 2014)。また、Wada らは大腸菌のメバロン酸生産菌において、さらに生産収率を向上するには増殖を抑制する必要があることや、生合成に必要な NADPH の多くがトランスヒドロゲナーゼによってまかなわれていることを ^{13}C 代謝フラックス解析の結果から明らかにした (Wada *et al.*, 2017)。

このように、 ^{13}C 代謝フラックス解析は、大腸菌を宿主とする有用物質の生産において、目的物質の収率を向上させるための代謝の改変戦略を提案する上で有効な手法である。特に、Okahashi らや Wada らの事例のように、目的物質の生合成の経路に NADH や NADPH などの還元力を必要とする場合、代謝経路のどの反応でどれだけ還元力が再生されるのかを見積もることができるため、目的に応じた合理的な代謝の改変戦略の立案が可能となる。特に目的物質生成に NADPH を必要とする場合、その NADPH 再生経路は比較的少数の反応に限られているため、そのフラックスがどれほど大きいかを知ることが収率向上にとって有効な情報となる。また、He らの脂肪酸の生産の事例の酸化的ペントースリン酸経路のように、代謝経路の分岐点に律速反応がある場合には目的物質の生産速度を低下させる原因となっている律速反応を予測することが可能である (He *et al.*, 2014)。しかし、 ^{13}C 代謝フラックス解析は定常状態を仮定した手法であるため、解糖系のように複数の連続した反応からなる直線経路においては、代謝経路中のどの反応が律速反応であったのかを見分けることはできない。すなわち、各中間代謝物質の物質収支を満たすため、直線状に反応が連続した経路では全て同じ値のフラックスが予測されてしまうことが理由である。

例えば、以下の直線の代謝経路においては、



A と B は中間代謝物質、矢印が反応、 V_1 から V_3 は反応速度とする。定常状態において

は A と B の時間変化がないため、

$$d[A] / dt = V_1 - V_2 = 0 \quad (\text{式 1-1})$$

$$d[B] / dt = V_2 - V_3 = 0 \quad (\text{式 1-2})$$

すなわち、 $V_1 = V_2 = V_3$ が成り立つ。この ^{13}C 代謝フラックス解析から求められるフラックスは、それぞれの反応を触媒する酵素の発現量や回転数、速度定数、代謝物質の濃度などが影響し合って、最終的に一定に落ち着いた結果である。このため、代謝経路の中でどの箇所の反応がより強く最終の目的物質の生産速度に影響を及ぼしているのか、その結果を導いた代謝反応の原因は、フラックスの情報だけでは判断することができない。

1.1.3.3 *in vitro* 酵素反応測定

代謝経路を担う酵素の触媒性能を表わす指標の 1 つが、酵素の活性 V_{\max} である。代謝フラックスは、実際の細胞内の代謝経路におけるある反応の反応速度である。それに対して、酵素の活性 V_{\max} は、その反応に関与する基質が十分に存在する環境における最大の反応速度を表わす。

酵素の V_{\max} を調べるには、細胞から取得した粗酵素抽出液や精製酵素を利用して、反応に必要な基質、補酵素、金属イオンなどを加え、反応の初速度を評価する。一般に、分光光度計で測定可能な吸光度の変化を伴う NADH や NADPH などの補酵素の生産や消費を測定することが多い。測定したい反応にこれらの補酵素が関与しない場合には、補酵素の生産や消費を伴う反応や吸光度変化のある色素反応とカップリングさせて測定する (Peng and Shimizu, 2003)。粗酵素抽出液の酵素の活性 V_{\max} は、代謝フラックスと同じ単位であるため、 ^{13}C 代謝フラックス解析から得られるフラックスの値と直接比較することが可能である。

各酵素の活性 V_{\max} を調べて、それに対応するフラックスと比較することで、酵素の性能として、まだフラックスを増加させる余地があるのか、それとも現在示されているフラックスが触媒しうる酵素の活性 V_{\max} の上限なのかを判断することができる。また、酵素ごとの活性 V_{\max} を測定することで、最も小さい値の V_{\max} をもつ酵素反応を特定でき、律速反応を予測することができる。酵素の活性は酵素の発現量を反映した値であり、さらに、翻訳後修飾の影響を受けた上で、実際に触媒として働くときの反応活性を示す値であり、酵素の回転数も考慮されている。このため、酵素の活性 V_{\max} は、プロテオーム解析の結果より直接的に代謝フラックスと比較して評価することが可能な指標である。

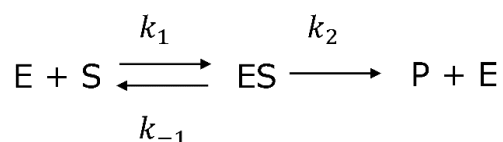
大腸菌の中心炭素代謝に関わるそれぞれの酵素の活性 V_{\max} も *in vitro* 酵素反応測定によって各々調べられている (Peng and Shimizu, 2003)。大腸菌の中心炭素代謝経路の各一遺伝子欠損株について、フラックス分布とそれぞれの酵素の活性 V_{\max} を比較することで、局所的な酵素の活性 V_{\max} の変化が、代謝経路の分岐点のフラックス比に及ぼした影

響が感度として評価されている (Peng and Shimizu, 2003; Zhu and Shimizu, 2005)。このように、代謝経路全体に関して酵素の活性 V_{\max} の情報を得ることは、細胞内の代謝経路上でなぜそのフラックスの分布が実現されているかについて、そのメカニズムを説明する上で有用な手掛かりとなる。しかし、酵素は酵素ごとに異なる基質特異性や至適温度、至適 pH などの酵素反応が進行するときの最適条件が異なるため、酵素の活性 V_{\max} の測定には、カップリング反応を含めた酵素ごとに異なる最適な測定系を構築し、酵素ごとに逐一測定を遂行しなければならない。そのため、代謝経路の全ての酵素反応に関してなど、複数の酵素の活性 V_{\max} を測定するには、多大な時間と労力、手間を必要とすることが課題であり、複数の酵素の活性 V_{\max} を同時に測定することは困難であった。

1.1.3.4 代謝経路の反応速度論モデル

複雑な代謝反応がどのように起きているかを示す代謝システムに関して、その動的な振る舞いの予測や、それぞれの代謝物質などの構成部品がシステム全体に及ぼす影響を統合的に解析するために、その代謝システムを対象に反応速度論モデルを構築することは非常に有効なアプローチである (Ishii *et al.*, 2004; Andreozzi *et al.*, 2016)。代謝経路に含まれる個々の反応速度は、酵素の反応速度論に基づいて速度式として記述することができる。

最もよく知られている、一基質一生成物の反応に関するミカエリス・メンテン式を例に説明する。基質 S が酵素 E に触媒され、生成物 P に変換される反応を考える。この反応を素反応に分解すると、まず S が E と結合し、酵素基質複合体 ES を形成する。ES は S と E に戻るか、P に変換される。ミカエリス・メンテン式では、ES から P が生成される後半の反応を律速反応であると考え、前半の反応は化学平衡にあると仮定する。この状態における素反応は以下である。



E と S、ES、P はそれぞれ酵素と基質、酵素基質複合体、生成物を表わす。素反応にはそれぞれに決まった速度定数があり、 k_1 と k_{-1} は第一段階目の反応の ES の生成反応のそれぞれ前向きと逆向きの速度定数を示し、 k_2 は ES が P に分解する第二段階目の反応の速度定数を示す。

定常状態において、ES の濃度変化は 0 であるため、式 1-3 が成り立つ。

$$d[ES]/dt = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \quad (\text{式 1-3})$$

[ES] と [E]、[S] はそれぞれ酵素基質複合体と酵素、基質の濃度を表わす。

また、P の生産速度 v は、ES を使って式 1-4 として記述できる。

$$v = d[P]/dt = k_2 [ES] \quad (\text{式 1-4})$$

[P]は生成物の濃度を表わす。

ES や E の濃度は直接測定できないため、酵素の全濃度を示す[E]_Tを用いて記述する。

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (\text{式 1-5})$$

式 1-4 と式 1-5 から式 1-6 が導き出せる。

$$v/[E]_T = k_2[ES] / ([E] + [ES]) \quad (\text{式 1-6})$$

さらに、式 1-4 を利用して、式 1-6 の[E]と[ES]を[E]_Tに置き換える。また、 $k_2[E]_T$ を V_{\max} 、 $(k_{-1} + k_2)/k_1$ を K_m とすると、式 1-7 が導き出される。

$$v = V_{\max} [S] / (K_m + [S]) \quad (\text{式 1-7})$$

式 1-7 はミカエリス・メンテン式と呼ばれる速度式で、多くの反応についてこの形式に近似することで、実際の現象をよく表現できることが知られている (Costa *et al.*, 2010, Eicher *et al.*, 2012; Goldbeter, 2013; Pulkkinen and Metzler, 2015)。数式に含まれる K_m は酵素と基質の親和性を表わすパラメータである。 K_m が小さい酵素は親和性が高く、基質濃度が薄いところで触媒能力が最大に到達する。上記で示したミカエリス・メンテン式を例とする数式モデルのように、実際の複雑な酵素反応について、代謝モデルを反応速度式で構築する研究が行われてきた (Chassagnole *et al.*, 2002; Kurata and Sugimoto, 2018)。上記のミカエリス・メンテン式の例では、一基質・一生成物の単純な速度式として表現されていたが、実際の代謝反応では複数基質・複数生産物の反応が数多く存在する。また、代謝酵素は、様々な代謝物が酵素の特定の部位に結合することで構造変化を引き起こして、酵素の活性部位が変更されることで、本来結合するはずであった反応基質が活性部位に結合することが阻害されたり、促進されたりするアロステリック制御を受けることが知られている。このように、実際の代謝システムをモデル化するには、複雑な反応機構のモデル化と多数のパラメータの取得が必要である (Spedding and Draper 1993; Beckett, 1998)。

大腸菌においては、生化学の研究において取得された豊富な酵素の反応速度論データに基づいて、様々な研究者が中心炭素代謝の反応速度論モデルを構築してきた。中心炭素代謝経路の上流の解糖系やペントースリン酸経路を含むモデルが Chassagnole らによって 2002 年に報告されている (Chassagnole *et al.*, 2002)。また、下流の TCA 回路やグルタミン酸生合成経路、一部の転写因子を含むアミノ酸生産を表現した反応速度論モデルが Usuda らによって 2010 年に報告されている (Usuda *et al.*, 2010)。Kurata らのグループは、大腸菌の中心炭素代謝モデルの正確な反応速度論モデルを構築し、カタボライト抑制の影響を表現した反応速度論モデルや細胞外の酸素濃度の影響を表現した反応速度論モデルを報告している (Jahan *et al.*, 2016; Kurata and Sugimoto, 2018)。Ishii らは解糖系

のグルコースからFBPまでの反応について、*in vitro* で酵素が働く実験系を再構築して、その振る舞いを予測可能な精緻な反応速度論モデルを構築した (Ishii *et al.*, 2007)。

反応速度論モデルを構成する反応速度式には、酵素と基質の親和定数 K_m 以外にも、阻害剤との阻害定数やヒル係数、 V_{max} など様々なパラメータが含まれる。 K_m など V_{max} 以外のパラメータは酵素固有の値であり、報告されている値を *in vitro* 実験にも *in vivo* の代謝の議論にもそのまま利用することができる。しかしながら、 V_{max} はそれぞれの酵素の発現量が関係するため、 V_{max} の値は *in vivo* の代謝を議論する際には実際の菌株や環境によって変化する。そのため、知りたい条件において反応速度論モデルを使ったシミュレーションを行うには、反応速度論モデルに含まれる全ての酵素反応について V_{max} の値を得る必要があるが、前項で述べたように複数の酵素の活性 V_{max} を測定することは多くの時間と手間を伴った作業である。

1.1.4 代謝経路における律速反応の同定とその課題

微生物の代謝反応の情報に基づいて代謝フラックスを増加させ、有用物質の生産速度を増加させるには、闇雲に代謝酵素の発現量を変化させるのでは非効率的であり、構築した細胞の培養評価において時間、労力、費用の浪費となってしまう。よって、微生物の代謝を利用して有用物質の生産効率を向上させることを目的として、その微生物の代謝経路のうちで改良すべき反応の候補となる律速反応を、理論的に推定することが、微生物の代謝システムの効率的な改変のために有用となると期待される。

前節 1.1.3 の細胞内代謝を評価するための解析技術で挙げたように、オミックス解析では、細胞内の代謝に関わるメタボロームやプロテオームなどの構成要素の網羅的な定量が可能になった。メタボローム解析によって、細胞内の代謝物質の蓄積量の知見 (Ohtake *et al.*, 2017) や、基質と生成物の濃度から反応における Gibbs 自由エネルギー変化の調査を行うことによって、代謝経路の律速反応の予測を行う指標となっている (Nagai *et al.*, 2018)。しかし、代謝物質の蓄積が反応のフラックスに与える影響は、酵素反応における酵素と代謝物質の親和定数に依存しており、さらには、反応を触媒する酵素の量や性能も反応速度に影響するため、メタボローム解析による情報だけでは代謝経路の律速反応を定量的に予測することは難しい。また、細胞内に微小に存在する代謝物質は定量測定が難しく、その代謝物質に関わる反応が代謝経路の律速反応の推定対象から外れてしまう場合も考えられる。また、プロテオーム解析については、代謝に関連する酵素の発現量を網羅的に定量することができ、各反応における触媒の存在量の大小を示す指標となるが、酵素の V_{max} について定量的な議論をするには酵素の回転数を考慮する必要がある。多くの酵素の回転数について、正確な値は分かっておらず、タンパク質は翻訳後修飾を受けて活性が変化することがあるため、酵素の発現量から直接 V_{max} を評価することはできず、プロテオーム解析の結果からだけでは律速反応の定量的な議論を行うことは難しい。

^{13}C 代謝フラックス解析において、目的物質の生合成に NADH や NADPH などの還元

力が関わっている場合、代謝経路のどの反応でどれくらい還元力が再生されるのかを算出して見積もることができるため、合理的な代謝経路の改変の設計および提案が可能 (Okahashi *et al.*, 2017; Wada *et al.*, 2017) となる。また、脂肪酸の生産の事例のように、代謝経路の分岐点に律速反応がある場合には、分岐点に着目して、フラックスの低下が見られる一方の反応を律速反応として予測することが可能である (He *et al.*, 2014)。しかし、¹³C 代謝フラックス解析では定常状態を前提とするため、解糖系のような複数の酵素の反応が連続したひと続きの反応経路では、複数の酵素反応において全て同じ値のフラックスが予測されてしまうため、経路中のどの反応が律速反応であるかを見分けることはできない。また、代謝フラックスはそれぞれの酵素反応が最終的に一定に落ち着いた結果であるため、代謝経路の中でどの箇所の反応がより強く最終の目的物質の生産速度に影響を及ぼすかは、フラックスの分布からだけでは結論づけることはできない。

in vitro 酵素反応測定では、細胞内の代謝のふるまいを直接観測することはできないが、*in vitro* での再構成系を用いて細胞内の代謝反応を模倣することによって詳細に各酵素の活性を測定することが可能である。また、*in vitro* 酵素反応測定は、細胞内における代謝経路のフラックス分布を理解し、代謝のメカニズムを説明する上で有用な解析手法である。しかし、基質特異性などの酵素の特性により、酵素ごとに実験条件が異なるため、その *in vitro* 酵素反応測定を、代謝経路に関連する全ての酵素を対象に遂行するには多大な時間と労力を費やさなければならず、複数の酵素の *in vitro* 酵素反応測定を同時に行うことが難しいことが課題である。

表 1 に、これまでの細胞内代謝の解析技術における律速反応の同定に対する現状での効果および課題を整理した。

表 1 これまでの細胞内代謝の解析技術における律速反応の同定に対する効果と課題

解析技術	律速反応同定における効果	律速反応同定における課題
メタボローム解析	代謝物質の蓄積量を測定。Gibbs 自由エネルギー変化に基づく反応の進行度合いを評価できる。	反応を触媒する酵素の含量と合わせて評価する必要がある。細胞内濃度が少なく測定できない代謝物質もある。
プロテオーム解析	酵素の発現量を測定。各反応の触媒量を評価できる。	酵素活性の比較には、酵素の回転数、翻訳後修飾の影響を考慮する必要がある。
¹³ C 代謝フラックス解析	細胞内における実際の反応速度を評価できる。	直線経路においては、どの反応が律速反応だったのかを決定できない。
<i>in vitro</i> 酵素反応測定	<i>in vitro</i> の反応系によって、着目する酵素の V_{\max} を測定。実際の反応速度と比較することで、律速反応を同定できる。	酵素ごとに測定系が異なるため、全ての酵素の <i>in vitro</i> 酵素反応測定には多大な時間と労力を要する。

本研究では、研究対象とする代謝経路の反応速度論モデルが存在する場合について、代謝経路の律速反応を同定するための方法論を確立することを目的とした。すなわち、図 1-3 に示すように、対象とする代謝経路に分岐箇所がある場合と代謝経路が直線状の連続的な経路の場合に場合分けをして律速反応の同定を行った。対象とする代謝経路に分岐箇所がある場合には、まず、¹³C 代謝フラックス解析を実施し、*in vitro* 酵素反応測定を組み合わせることで律速反応を同定した。次に、より細分化された直線状の連続的な経路を対象とする場合には、反応速度論モデルを導入し、*in vitro* 代謝経路解析（本研究で開発した粗酵素抽出液による *in vitro* 酵素反応系と中間代謝物質濃度の時系列データを利用した複数酵素の V_{\max} の同時推定は、従来の *in vitro* 酵素反応測定と区別するため、以降「*in vitro* 代謝経路解析」と記述する。）と組み合わせることで経路内の全酵素の V_{\max} を同時推定し、最小の V_{\max} をもつ反応を律速反応として同定した。

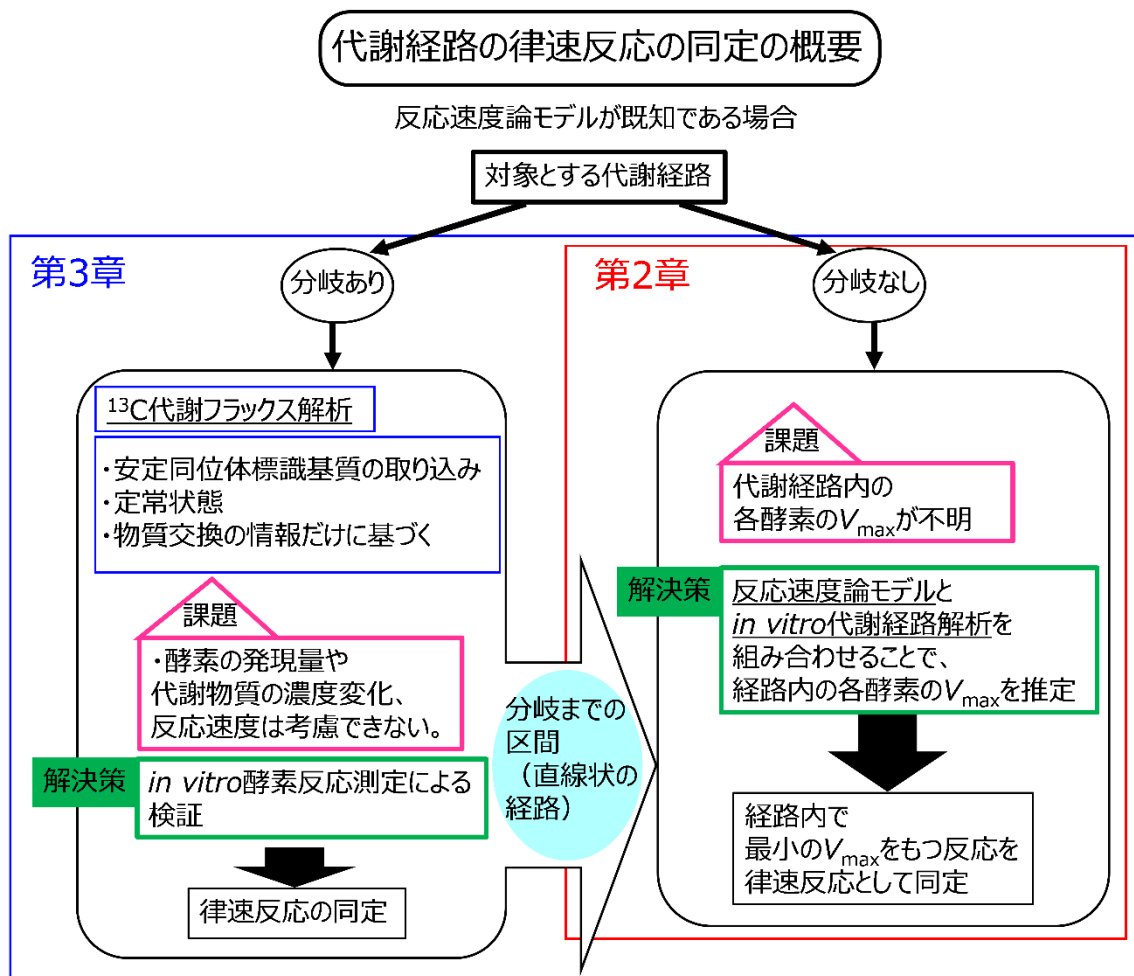


図 1-3 代謝経路の律速反応の同定の概要とその過程における課題

対象とする代謝経路の反応速度論モデルが既知である場合における代謝経路の律速反応の同定の概要を図示した。代謝経路の分岐箇所の有無によって分類して考えた。

1.2 本論文の目的および構成

本論文では、代謝経路の形状によって異なる手法を組み合わせた律速反応の同定手法の開発を目的に研究を行った。開発した律速反応の同定手法の概要 (図 1-3) は次の通りである。分岐のある経路では、 ^{13}C 代謝フラックス解析によって分岐箇所における律速反応を推定し、さらに *in vitro* 酵素反応測定によって律速反応の酵素の V_{\max} を測定することで検証を踏まえて律速反応を同定した。また、分岐までの直線経路では、反応速度論モデルと *in vitro* 代謝経路解析を用いた複数酵素の V_{\max} の同時推定によって、代謝経路の全酵素の V_{\max} を推定し、その中で最小の V_{\max} をもつ酵素の反応を代謝経路の律速反応として同定するという手法を構築した。次の 2 点に、研究を行った内容を述べた。

まず、第 2 章で述べた研究では、大腸菌の中心炭素代謝経路の一部である、直線経路の解糖系を対象に、反応速度論モデルを導入して実施した *in vitro* 代謝経路解析によっ

て、全ての酵素の V_{\max} を同時推定することで、律速反応を同定する手法を開発した。さらに、同定された律速反応の検証を行った。

次に、第3章では、大腸菌の培養条件で増殖低下が引き起こされるフェノールの添加条件において、そのときの代謝状態の変動に関して、 ^{13}C 代謝フラックス解析と *in vitro* 酵素反応測定を適用することによって、経路に分岐がある大腸菌の中心炭素代謝経路全体において増殖低下の要因となる律速反応を同定した。さらに、第2章で開発した、対象経路の全酵素の V_{\max} の同時推定法による律速反応の同定手法を適用し、分岐までの一連の直線状の代謝経路の例として、中心炭素代謝経路の上流部分である解糖系について、フェノールのありなしという異なる条件における大腸菌の解糖系の律速反応の同定という応用例を実施し、大腸菌の代謝反応へのフェノールの影響を明らかにした。

本論文は第1章から第4章までで構成される。

第1章では、緒論と題して、研究の背景と本論文の目的および構成について述べた。

第2章では、「反応速度論モデルと *in vitro* 酵素反応測定を用いた律速反応同定法の開発」と題し、反応速度論モデルと *in vitro* 酵素反応測定を用いた、代謝経路内の複数酵素の V_{\max} の同時推定による律速反応の同定手法を開発した。対象とする代謝経路は既存の反応速度論による代謝モデルが存在する大腸菌の解糖系とした。反応速度論による代謝モデルに仮定の V_{\max} の値を代入して発生させた時系列の代謝物質の濃度の仮想実験データと、実際の大腸菌の粗酵素抽出液を用いた *in vitro* 代謝経路解析によって、対象の解糖系の全ての酵素の V_{\max} を同時推定することで、律速反応を同定した。

第3章では、大腸菌の増殖に影響を与え、代謝にも変動を与える化学物質の例として、フェノールを添加することによる大腸菌の増殖低下が生じるときの律速反応を同定した。フェノールの代謝における影響について、 ^{13}C 代謝フラックス解析と *in vitro* 酵素反応測定、および、第2章の複数酵素の V_{\max} 同時推定法による律速反応の同定法を用いて、律速反応を推定することによって調べた。 ^{13}C 代謝フラックス解析と *in vitro* 酵素反応測定から、フェノール添加によって大腸菌に比増殖速度の低下が引き起こされるのは、中心炭素代謝経路下流の TCA 回路のクエン酸シンターゼが原因の一つであり、律速反応であると突き止めた。さらに、第2章の直線経路における複数酵素の V_{\max} 同時推定法の適用により、 ^{13}C 代謝フラックス解析だけでは分からなかった、大腸菌の中心炭素代謝経路の上流部分の直線経路の解糖系へのフェノールの影響による律速反応を調査した結果を示した。このことによって、複数酵素の V_{\max} 同時推定による律速反応の同定手法の応用例を挙げることができた。本研究で例に挙げた大腸菌の増殖低下時の代謝の変動を詳細に理解するためには、第2章で開発した *in vitro* 代謝経路解析を用いた複数酵素の V_{\max} 同時推定法による律速反応の同定手法が有効であることを示した。

第4章では、本研究で新たに開発した複数酵素の V_{\max} の同時推定による律速反応の同定の結果を、 ^{13}C 代謝フラックス解析と *in vitro* 酵素反応測定による律速反応の同定結果とともに考察し、微生物の代謝経路の律速反応の同定に対する本研究の寄与と今後の展望について述べた。

第2章 反応速度論モデルと *in vitro* 酵素反応測定を用いた律速反応同定法の開発

2.1 緒言

微生物の代謝経路を利用することで、燃料、プラスチック、ポリマー、医薬品の原料などの様々な有用化学物質を生産させる研究が行われている。しかしながら、今なお多くの有用化合物の物質生産の事例において目的物質の生産性の向上させることが、微生物を用いた有用化合物の物質生産を研究レベルから産業化へと展開させる上での大きな課題であり、微生物代謝を用いた物質生産の生産速度の改善が切望されている。細胞あたりの目的物質の生産速度を合理的に効率よく向上させるには、目的物質を生産する宿主微生物の代謝経路中の律速反応を見出し、その反応の酵素の発現量を増やすことで、基質から目的の化合物までに至る経路全体のフラックスを増加させることが望ましい。代謝工学では、代謝経路の律速反応を同定し、その律速反応であった反応を強化するための様々な研究がなされてきた (Emmerling *et al.*, 1999; Takemura *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015; Hara *et al.*, 2019)。

^{13}C 代謝フラックス解析による代謝経路の炭素の流れの推定は、代謝工学の手法ではよく行われる手法である (Zamboni *et al.*, 2009; Toya and Shimizu, 2013)。 ^{13}C 代謝フラックス解析が明らかにできるのは代謝経路の実際の反応速度であり、代謝経路の中で律速反応となる反応を直接は同定することはできない。すなわち、この ^{13}C 代謝フラックス解析では定常状態を仮定した手法であり、分岐のある代謝経路では分岐の箇所においてフラックスが小さくなっている反応を律速反応として特定することが可能である。一方で、 ^{13}C 代謝フラックス解析では、解糖系のような分岐がなく一本道の連続的な経路のフラックスは、同じ大きさに落ち着いてしまうため、代謝経路中のどの箇所の反応が律速反応であるのかを知ることはできないという課題がある。

各酵素の触媒性能を示す活性 V_{\max} は、*in vitro* での酵素反応測定法によって反応速度が測定されて、評価されてきた (Peng and Shimizu, 2003)。 V_{\max} は各酵素が触媒することができる最大の反応速度であり、代謝経路の律速反応を同定するための重要な手掛かりとなる (Peng and Shimizu, 2003; Kitamura *et al.*, 2019)。さらに、 V_{\max} の値は、代謝経路全体のフラックスに影響を及ぼす反応を知るために役立つ糸口である。多くの場合、酵素活性 V_{\max} は、NADH や NADPH、または比色定量できる化合物の生産や消費を示す吸光度の時系列の変化を計測することで測定される (Peng and Shimizu, 2003)。よって、酵素の活性 V_{\max} を求めるためには、それぞれの酵素についてカップリング反応を伴う異なる V_{\max} の測定方法を利用し、酵素 1 つ 1 つにつき、別々の反応条件において実験する必要がある。このような従来法における *in vitro* 酵素反応測定では、一度の実験において同時に複数種類の酵素の V_{\max} を測定すること困難であり、複数種類の酵素の V_{\max} を測

定することは、それだけで多大な時間と手間、労力を伴った仕事である。

試験管内における代謝経路の再構成系は、システムの振る舞いや制御の仕組みを調査する上で有効な方法である。この *in vitro* 実験では、反応に必要な基質や補酵素を含む緩衝液の反応液に代謝経路に含まれる複数の酵素の混合液を加えることで、一連の代謝経路を駆動することができる。目的の代謝経路を駆動するために必要な酵素の混合液や細胞内で働いている複数の酵素が含まれる粗酵素抽出液を利用して、解糖系 (Garcia *et al.*, 2018) やエントナー・ドウドロフ経路 (ED 経路) (Liang *et al.*, 2018; Okano *et al.*, 2020)、アミノ酸合成 (Zhang *et al.*, 2015; Hanatani *et al.*, 2019)、脂肪酸 (Yu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017) やメバロン酸 (Zhu *et al.*, 2014; Dudley *et al.*, 2016)、テルペノイド (Dudley *et al.*, 2019) の生産経路が *in vitro* の再構成系で実際に駆動できたことが報告されている。

in vitro の実験は、培養などの細胞内の状態を扱う実験に比較して、実験条件を目的に応じて調節することが容易であるので、*in vitro* 実験によって代謝経路を再構成することで良質な代謝物質の濃度の時系列データを取得することが可能である。そこで本研究では、律速反応を同定するために、反応速度論モデルを用いて、*in vitro* 代謝経路解析によって取得した中間代謝物質の濃度の時系列データを説明するように最適化することで、対象経路の複数の酵素の V_{\max} の値を同時に推定する手法を開発した。図 2-1 に本研究で開発した複数酵素の V_{\max} を同時推定し、律速反応を同定する手法の概要を示した。

第 2 章では、図 2-1 に示したように、粗酵素抽出液を用いた代謝経路の再構成系の *in vitro* 代謝経路解析で取得した時系列における代謝物質濃度データから反応速度論モデルを導入することで各酵素の V_{\max} を同時に推定する方法を考案した。ここで、*in vitro* 代謝経路解析による基質と生成物の代謝物質の濃度変化の相関から V_{\max} の小さい反応を推察できる場合もある。しかし、反応速度は基質濃度だけでなく、それぞれの反応に関わる補酵素や阻害物質の濃度の影響を受けるため、反応速度論モデルを用いた複数酵素の V_{\max} の推定が必要である。以上の理由により、反応速度論モデルを用いた、実験値と反応速度論モデルに従ったシミュレーション値との差を最小とするような最適化による複数酵素の V_{\max} の同時推定を行うこととした。また、開発した手法を大腸菌の解糖系を対象に使用し、解糖系の経路内で最小の V_{\max} をもつ反応を律速反応とすることで、律速反応を同定した。本研究において対象とした解糖系の反応経路を 2.2.1 の図 2-2 に示した。さらに、本研究の結果、同定された律速反応の妥当性について、*in vitro* および *in vivo* の実験系の両方で検証した。

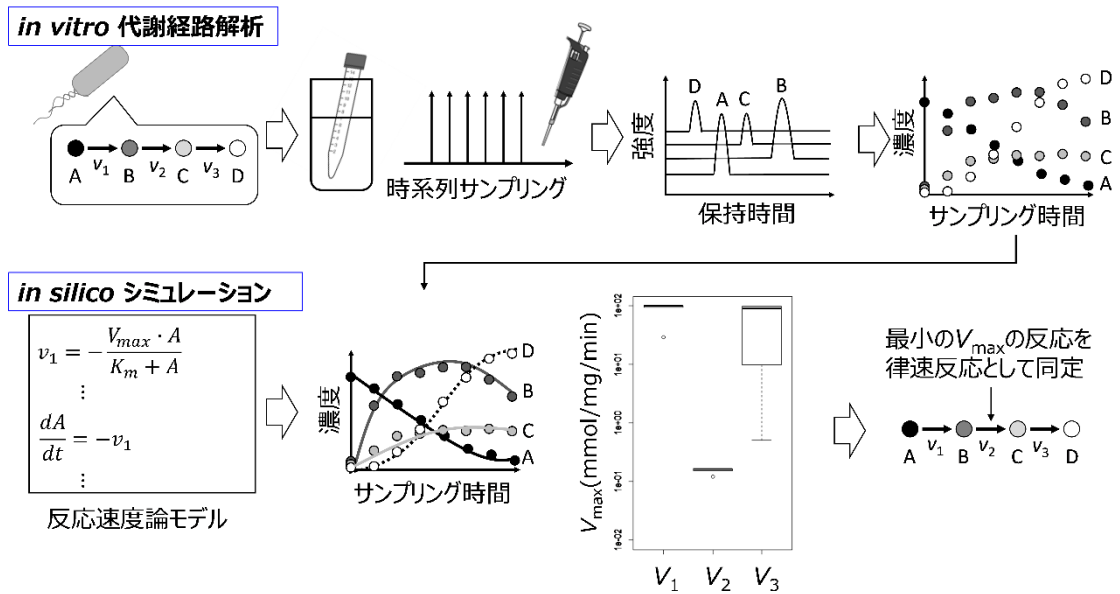


図 2-1 複数酵素の V_{max} の同時推定による律速反応の同定手法の概要

まず、大腸菌の粗酵素抽出液を用いて代謝経路を再構成することで *in vitro* 反応系で駆動させ、時系列による代謝物質濃度データを得る。次に、得られた時系列による代謝物質の濃度データと一致するように、反応速度論モデルによって各酵素の V_{max} を同時に推定し (*in vitro* 代謝経路解析)、対象の代謝経路内で最小の V_{max} をもつ反応を律速反応として同定する。

2.2 手法と材料

2.2.1 対象とした代謝経路

第2章で対象とした代謝経路は、大腸菌 *Escherichia coli* の中心炭素代謝経路の解糖系である (図 2-2)。

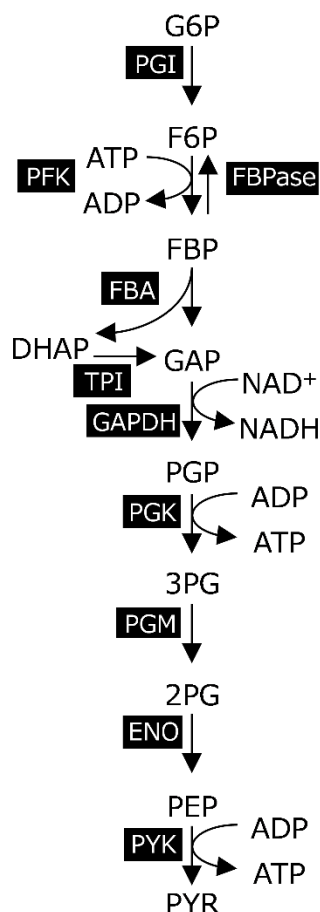


図 2-2 本研究で対象とした大腸菌の解糖系の反応経路

黒地の箱に白抜き文字で表したものが各反応で触媒する酵素名の略語を示し、その他は代謝物質および補酵素の略語を示した。矢印は反応の向きを示した。

2.2.2 使用した反応速度論モデル

先行研究に基づいて、G6P から PYR までの解糖系の反応速度論モデルを構築した。PGI の反応速度式については、今回はペントースリン酸経路の 6PG による阻害の影響を考慮する必要がないため、Ishii らの 2007 年の報告のものを採用した。ただし、平衡定数 Keq については、Ishii らの値を用いると実際の大腸菌の粗酵素抽出液を用いて実測したデータを説明できなかったため、Kurata and Sugimoto の 2018 年の報告による値に変更した。PFK については Ishii らの 2007 年の報告に記載されている反応速度式を採用した。FBA、TPI、GAPDH、PGK、PGM、ENO、PYK については、Chassagnole らの

2002 年の報告に記載されている反応速度式を採用した。付録の Supplementary Table S2 に反応速度論モデルの微分方程式を、Supplementary Table S3 に反応速度論モデルに使用した反応速度式とパラメータを示した。初期の代謝物質濃度は、2.2.8 に後述する *in vitro* 酵素反応実験の条件と同じに設定した。G6P 5 mM、NAD⁺ 5 mM、ATP 1 mM、ADP 5 mM、それ以外の代謝物濃度は 0 mM とした。仮想実験および V_{\max} の最適化は Matlab R2020a 上で行い、数値積分には ode15s ソルバーを用いた。

2.2.3 仮想実験

本手法の概念実証のため、モデルに V_{\max} のセットを与え、その条件でシミュレーションを実施した。シミュレーションによって求めた代謝物の時系列データを仮想実験データとして利用して、元の V_{\max} の値が正しく推定できるかを調べた。

仮想実験は、解糖系の経路の上流と下流に V_{\max} が小さい反応がそれぞれ存在する 2 条件について実施した。仮想実験 1 では、PFK の V_{\max} だけが 0.01 mmol/mg/min、他の 9 つの反応の V_{\max} は 1 mmol/mg/min とした。仮想実験 2 では PGK の V_{\max} だけが 0.01 mmol/mg/min、他の 9 つの反応の V_{\max} は 1 mmol/mg/min とした。*in vitro* の実験と同様に、反応開始から 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30 分目に濃度データを取得した。このように、酵素ごとにある V_{\max} の値を代入して反応速度論モデルを動かすことによるシミュレーションから得られた時系列の代謝物質濃度のデータに、変動係数が 5%となるノイズを加えることで仮想実験データとした。

評価対象とした、G6P、F6P、FBP、DHAP、GAP、3PG、PEP、PYR の 8 種類の間代謝物質うち、初期の濃度が既知である基質の G6P は絶対値をデータとして用いた。その他の物質については、30 分目の濃度値を「1」とするように正規化したデータを相対濃度として、実験値と反応速度論モデルに従う数値積分によるシミュレーション値との差を最小にする最適化を行う際の実験値のデータとして用いた。

2.2.4 複数酵素の V_{\max} の同時推定による律速反応の同定方法

仮想実験データと反応速度論モデルに従う数値積分によるシミュレーションの結果との残差二乗和 (RSS) が最小になるように、反応速度論モデルに含まれる V_{\max} の値を最適化した。評価関数を下の式 2-1 に示した。

$$RSS = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^k (E_{i,j} - S_{i,j})^2 \quad (\text{式 2-1})$$

ここで、 E : 実験データ (仮想実験のデータを含む)、 S : 反応速度論モデルに従う数値積分によるシミュレーションデータ、 n : 評価対象の中間代謝物質の数、 k : サンプルングタイムポイント数を表わす。

第 2 章における最適化計算には、大域的最適化の手法である Global Optimization Toolbox (Matlab) の遺伝的アルゴリズム (GA) を用いた。GA は生物の適応進化を模倣した自然淘汰プロセスによる広域最適化の計算手法である。各世代の計算において、複数の個体 (最適化変数のセット) からなる母集団を生成し、その中で適応度が高い個体を評価関数に基づいて選択する。次の世代の母集団を生成する際に交叉や変異という生物の適応進化の仕組みを利用するのが特徴である。本解析で実施した GA では、最大世代時間を 1000 回、個体数 200 個体、エリート保存数 10、変異率や交叉方法はデフォルト値に設定した。また、各酵素の V_{\max} の最適化範囲は 0.01 - 100 mmol/mg/min に設定した。

この複数酵素の V_{\max} の同時推定方法によって得られた V_{\max} の結果から、対象の代謝経路上で最小の V_{\max} をもつ反応を律速反応として同定した。

2.2.5 使用菌株

本研究第 2 章の実際の大腸菌粗酵素抽出液を用いた *in vitro* 代謝経路解析および従来法の *in vitro* 酵素反応実験で用いた菌株は大腸菌 K-12 の ASKA clone (Kitagawa *et al.*, 2005) の宿主株 AG1 (遺伝子型 *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) supE44 relA1, pCA24N, -gfp*) であり、これをコントロール株とした。

定常期培養による律速反応の同定結果の検証では、大腸菌 K-12 の宿主株 AG1 をコントロール株として用いた。また、比較対象として、解糖系の各一遺伝子過剰発現株、すなわち、*pgi*、*pfkA*、*fbaB*、*tpiA*、*gapA*、*pgk*、*pgmA*、*eno*、*pykF* の 9 種類の各遺伝子の過剰発現株を用いた (Kitagawa *et al.*, 2009)。

2.2.6 菌体取得とその培養条件

in vitro 酵素反応実験に用いる菌体取得では、前培養に LB 培地を用いた。LB 培地は、LB Broth (SIGMA) を Elix 水に 20 g/L となるように溶解し、121°C、20 分間、オートクレーブにより滅菌した。LB 培地に終濃度 25 µg/mL のクロラムフェニコールを加えたものを試験管に 4mL ずつ分注し、37°C、150 rpm で一晩、前培養を行った。

その後、本培養ではバッフル付き 200 mL 容フラスコに、4 g/L のグルコースを炭素源として含む M9 最小培地に、終濃度 40 µg/mL のヒスチジンと終濃度 25 µg/mL のクロラムフェニコールを加えたものを 50 mL 加え、初期 OD₆₀₀=0.05 となるように前培養液を植菌した。*in vitro* 酵素反応実験に供する菌体の取得のための培養で用いた M9 最小培地は、Na₂HPO₄ · 12 H₂O 17.1 g/L、KH₂PO₄ 3 g/L、NaCl 0.5 g/L、NH₄Cl 2 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 0.123 g/L、FeSO₄ · 7H₂O 0.00278 g/L、CaCl₂ · 2 H₂O 0.0147 g/L Thiamine-hydrochloride 10 mg/L、グルコース 4 g/L を MilliQ 水に溶解し、金属イオンおよびグルコースはフィルターによって滅菌した。その他の成分は混合調製したストック溶液をフィルター滅菌した。

本培養では、BioShaker BR-43FL (TAITEC)を用いて 37°C、150 rpm にて培養を行い、

培養開始後 6 時間後に Isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 100 μ M になるように添加し、さらに 16 時間培養を行った。この定常期の培養状態において 12 mL ずつ、およびその余剰分を合計 5 本に分注し、4°C、10,000 rpm、10 分間、遠心分離することによって菌体ペレットを得た。菌体ペレットは使用時まで -80°C にて保存した。

細胞濃度は分光光度計 UVmini-1240 (Shimadzu) を用いて OD₆₀₀ として測定した。OD₆₀₀ を乾燥菌体重量に変換した (Soini *et al.*, 2008)。

2.2.7 粗酵素抽出液の調製とタンパク質濃度定量

粗酵素抽出液の調製には、氷上にて、菌体の回収液量の 1/30 量の Wash Buffer (50 mM Sodium phosphate (pH7.0)、200 mM NaCl、Protease inhibitor cOmplete Tables、Mini EDTA-free、EASY Pack 5 tablets/ 50 mL (Roche)) で懸濁し (Kitagawa *et al.*, 2005)、1.5 mL エッペンチューブに移して、4°C、15,000 \times g、5 分間遠心分離を行って、上清を除くことで、培地成分を洗浄・除去した。再び、氷上で、菌体回収量の 1/30 量の Wash Buffer を加え、懸濁後、BIORUPTOR (COSMOBIO Co., LTD.) にて、レベル High で 5 秒または 30 秒おきに 6 分間氷水中で超音波処理を行った。その後、4°C、20,000 \times g、20 分間の遠心分離を行い、上清を粗酵素抽出液として 4°C で保存した。超音波破碎が不十分で、溶液が薄黄色にならず、遠心後の残渣が多い場合は、再度ペレットを懸濁させてから超音波処理を追加で実施した。粗酵素抽出液は調製後 4°C で保存し、調製後の *in vitro* 酵素反応への使用はできるだけ早くすることとし、調製後からの使用期間は最長でも 3 日以内とした。

粗酵素抽出液の総タンパク質量は Pierce BCA Protein Assay Kit を用いて定量した。BSA を標準溶液として検量線を作成し、570 nm の吸光度を測定することで算出した。吸光測定に用いたプレートリーダーは、Wallac 1420 Workstation を搭載した ARVO MX 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer Precisely) である。

2.2.8 実際の大腸菌の粗酵素抽出液を用いた *in vitro* 代謝経路解析

2.2.8.1 反応液組成と反応条件

反応液の緩衝液の組成は、先行研究に基づいて 50 mM NH₄HCO₃、2 mM Na₂HPO₄ \cdot 12 H₂O、0.4 mM MOPS、2.5 mM MgCl₂ とした (Bujara *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017)。基質として、1 mM ATP、5 mM ADP、5 mM NAD⁺、5 mM G6P を加えた。反応開始前に水浴またはヒートブロックを用いて 5 分間、37°C でインキュベートし、反応直前に粗酵素抽出液を反応液容量の 1/20 加えて開始し、総反応時間は 30 分として 37°C で反応を行った。0 分目のサンプルは、粗酵素抽出液の代わりに同じ容量になるように Wash Buffer を加えたものを用いた。サンプリング時の反応液の混合調製は下記の通りに行った。500 mM NH₄HCO₃ 300 μ L、20 mM Na₂HPO₄ \cdot 12 H₂O 30 μ L、40 mM MOPS 30 μ L、250 mM MgCl₂ 30 μ L、100 mM ATP 30 μ L、100 mM ADP 150 μ L、50 mM NAD⁺ 300 μ L、100 mM G6P 150 μ L、粗酵素抽出液 150 μ L、MilliQ 水 1830 μ L を混合して、総反応液量を 3000 μ L とし

た。0分目のサンプルは、粗酵素抽出液の代わりに同じ容量になるように Wash Buffer を加えたものを用い、別途総反応液量が 0.4 mL となる反応液から 1 回サンプリングを行った。

2.2.8.2 NADH 濃度の測定

紫外可視近赤外分光光度計 V-750 (JASCO ENGINEERING) を用いて、時間変化測定プログラムによって経時的に 340 nm の吸光度を測定することで NADH の生産速度を計測した。NADH の 340 nm におけるモル分子吸光計数は 6.22 L/mmole/cm とした。酵素反応液の吸光度測定には、UV-Cuvette micro (BRAND GMBH + CO KG) のキュベットを用いた。時系列で反応液をサンプリングする実験を行う前に、時系列で NADH 濃度を計測することで、粗酵素抽出液の添加濃度と適切な基質の濃度を検討し、反応液中の NADH の濃度が平衡に到達して、解糖系の NADH の生成までの反応 (図 2-3) が終了したと考えられてサンプリングを終了させてもよい時間を検討した。

NADH 濃度の測定による検討時の反応液の混合調製は下記の通りに行った。500 mM NH_4HCO_3 100 μL 、20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10 μL 、40 mM MOPS 10 μL 、250 mM MgCl_2 10 μL 、100 mM ATP 10 μL 、100 mM ADP 50 μL 、50 mM NAD^+ 100 μL 、100 mM G6P 50 μL 、粗酵素抽出液 (1/10 容量) 100 μL 、MilliQ 水 560 μL を混合して、総反応液量を 1000 μL とした。または、粗酵素抽出液の量に合わせて、最小の総反応液量を 500 μL で NADH 濃度の測定を実施した。

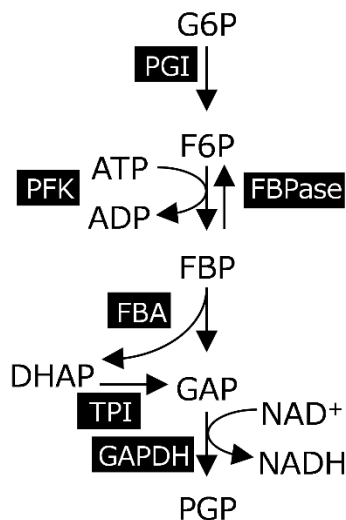


図 2-3 NADH の生産までの解糖系の反応経路

図 2-2 に示した本研究で対象とした解糖系の経路 (G6P から PYR まで) のうち、NADH を生産する経路までの反応に注目した。この NADH 生産までの反応までの経路においては、PGI、PFK、FBPase、FBA、TPI、GAPDH の 6 つの酵素による反応が駆動している。

2.2.8.3 時系列サンプリング方法

30 分間の *in vitro* 酵素反応中、0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30 分目にコールドメタノール法による中間代謝物質のクエンチを行い、サンプルを回収した。メタノールには、分取後、予め、LC-MS/MS 測定時の内部標準物質である D-カンファースルホン酸を終濃度 20 μM になるように加えておいた。コールドメタノール法では、この内部標準物質を含むメタノールを予め -80°C で 5 分以上冷やしたものを、15 mL 容ファルコンチューブに分注しておき、採取した反応液を氷上で速やかに混和することで、反応を停止させ、抽出時まで -80°C で保存した。その後、メタノール・クロロホルム・水法によって水層を抽出し、タンパク質成分を除去した。今回の実験ではメタノール：クロロホルム：水 (*in vitro* 酵素反応液) の比率が 5 : 5 : 2 となるように処理した。以下に抽出操作を示した。コールドメタノール法によってサンプリングしたメタノール混合溶液に予冷したクロロホルムを添加して 1 分間ボルテックスによって十分混合し、1 分間、氷水中で超音波処理を行った後、遠心分離を行った (4°C 、 $4000\times\text{g}$ 、20 分間)。サンプルが 2 層に分かれたことを確認し、境界面付近はできるだけ吸い取らないようにしながら、各サンプルから慎重に上層を採取した。1 サンプルにつき、50 μL または 100 μL を 2-3 本分の新しい 1.5 mL エッペンチューブに分注し、SAVANT SPD1010 SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific) を用いて常温で減圧乾固し、分析まで -80°C で保存した。LC-MS/MS で分析する際には、採取容量と等量の MilliQ 水で復元した。

2.2.8.4 代謝物質濃度の測定

中間代謝物質の定量分析には液体クロマトグラフィー・質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた (液体クロマトグラフィー; HPLC (Agilent 1100series; Agilent Technologies), 質量分析部; MS/MS (API 2000TM LC-MS/MS システム; AB SCIEX)。中間代謝物質のピークは市販の標準物質のクロマトグラフと保持時間を比較して同定し、ピーク面積の算出には Analyst Software Version 1.6.1 (AB SCIEX) を用いた。表 2-1 に HPLC の分析条件、表 2-2 にイオン源パラメータ、表 2-3 に MS/MS の分析パラメータを示した。また、解糖系の中間代謝物質および内部標準物質の Multiple reactions monitoring (MRM) パラメータを表 2-4 に示した。分析条件、分析パラメータは先行研究 (Nishino *et al.*, 2015) にならった。

表 2-1 HPLC 分析条件

カラム	ProteCol-P C18 HQ103 150 mm × 2.1 mm × 3 μm (SGE analytical Science) または ProteCol C18Q 100Å 3μm / 150 mm×2.1 mm ID × 3μm, PC HPLC, 粒 径:3 μm 穴径 100Å (TRAJAN)
溶離液	(A) 15 mM トリブチルアミン, 10 mM 酢酸水溶液, (B) メタノール
グラジエント	A:100% (~5.0 min) ~A:10%, B:90% (~24.0 min) ~A:100% (~24.1 min) ~A:100% (30 min)
流速	0.2 mL/min
注入量	1 μL
カラム温度	35°C

表 2-2 イオン源パラメータ

Ion source	Turbo spray
Curtain Gas	30 psi
Collision Gas	5 psi
Ion spray Voltage	-4500 V
Temperature	550°C
Ion Source Gas1	60 psi
Ion Source Gas2	60 psi
Interface Heater	ON

表 2-3 MS/MS 分析パラメータ

Mass 分析モード	負イオンモード
Gas temp	300°C
Gas flow	10 L min ⁻¹
Nebulizer	55 psi
Sheath gas temp	380°C
Sheath gas flow	11 L min ⁻¹
Capillary pos/neg	3500/3500 V
Nozzle voltage pos/neg	1000/1000 V
Resolution Q1/Q3	Wide/Wider
EMV 電圧	2000 V

表 2-4 中間代謝物質および内部標準物質の MRM パラメータ

Compounds	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Declustering Potential (V)	Entrance Potential (V)	Collision Energy (V)	Collision Cell Exit Potential (V)
G6P/F6P	259	79	-30	-4.5	-22	-4
FBP	339	97	-35	-4.5	-76	-4
DHAP/GAP	169	97	-20	-4.5	-16	-4
2PG+3PG	185	79	-25	-4.5	-20	-4
PEP	167	79	-25	-4.5	-22	-4
PYR	87	43	-25	-4.5	-14	-4
ADP	426.1	79	-60	-4.5	-70	-4
ATP	506.1	79	-65	-4.5	-114	-4
NAD	662.3	79	-25	-4.5	-120	-4
NADH	664.3	79	-95	-4.5	-122	-4
dCS	231	79.9	-60	-4	-64	-4

時系列代謝物質データの取り扱い

中間代謝物質のうち、PGPは市販にて標準物質を入手できなかったため、測定対象としなかった。また、この測定法では、リン酸基の位置によってMRMを分けているため、3PGと2PGは同じMRMとして検出されて分離が困難であることから、3PGと2PGは混合物質「3PG+2PG」として扱った。一方、同じMRMとして検出されるG6PとF6P、およびDHAPとGAPは、市販の標準物質の分析によってクロマトグラムの保持時間によって異なる物質として分離・検出が可能であることから、異なる物質として扱うことが可能であった。

代謝物濃度データの取り扱いは、仮想実験の場合と同様に、評価対象とした8種類の中間代謝物質のうち、初期の濃度が既知である基質のG6Pは絶対値をデータとして用いた。上記理由から、3PGは、仮想実験では3PG単独で扱ったが、*in vitro* 酵素反応による時系列の中間代謝物質データを用いた場合の実験データでは「3PG+2PG」として扱った。その他の物質については、30分目の濃度値を「1」とするように正規化したデータを相対濃度として、実験値と反応速度論モデルに従う数値積分によるシミュレーション値との残差二乗和RSSを最小にする最適化を行う際のデータとして用いた。

2.2.9 律速反応酵素の添加実験による律速反応同定結果の検証 (*in vitro*)

律速反応と推定されたFBAの V_{max} の値の測定による検証を、従来法の*in vitro* 酵素反応測定によって行った。fructose bisphosphate aldolase (FBA) 活性は、triosephosphate isomerase (TPI) と glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の反応とカップリングすることで測定した(Peng and Shimizu, 2003)。1 cm キュベットの中で以下の反応液を調整し、NADHの減少として340 nmの吸光度変化から測定した。反応液は500 μ Lとし、反応液の組成は、0.05 M Tris-HCl pH7.5、0.1mM cysteine-hydrochloride、0.1M potassium acetate、0.7 mM CoCl₂、2 mM FBP、0.25 mM NADH、20 U TPI、2 U GAPDH、コントロール株の粗酵素抽出液のタンパク質量 0.128 mgで反応を実施した。用いたキュベットは、2.2.8.2 「NADH濃度の測定」に記述した。

また、2.2.8.1で示した*in vitro* 酵素反応測定の酵素反応液の組成によって、2.2.8.2の手順に従って、NADH濃度の測定を行い、律速反応であると推定された精製FBAを添加することによって、解糖系の中でNADHの生産までの経路(図2-3)においてどの程度解糖系における代謝反応が進行しやすくなったのかを調べた。解糖系の進行に関する評価において、*in vitro* 反応系500 μ L中に加えた精製FBA (Sigma-Aldrich) は10 U、粗酵素抽出液のタンパク質量は0.128 mgとした。NADH濃度の時系列変化は、2.2.8.2 「NADH濃度の測定」に記述した通り、紫外可視近赤外分光光度計 V-750 (JASCO) を用いて、時間変化測定プログラムによって経時的に340 nmの吸光度を測定することで実施した。

2.2.10 定常期培養による律速反応同定結果の検証 (*in vivo*)

定常期培養による律速反応同定の検証では、コントロール株と、比較対象として、解糖系の各一遺伝子過剰発現株、すなわち、*pgi*、*pfkA*、*fbaB*、*tpiA*、*gapA*、*pgk*、*pgmA*、*eno*、*pykF* の 9 種類の各遺伝子の過剰発現株を用いた (Kitagawa *et al.*, 2009)。

定常期培養における評価のために用いた培地は、増殖期までは先の 2.2.6 に記述した M9 最小合成培地を用い、定常期の培養では、増殖することを抑制するために硫黄欠損とし、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の代わりに FeCl_3 1.62 g/L を加えた硫黄欠損 M9 最小合成培地を用いた。この条件にて、 $\text{OD}_{600} = 5$ をとなるように菌体濁度を調節することで、定常期の本培養での実験を行った (Masuda *et al.*, 2017; Tokuyama *et al.*, 2019a)。また、追加で実施した定常期培養による評価でのコントロール株と *fbaB* 過剰発現株との再現性確認実験では、10 g/L のグルコースを炭素源とする硫黄欠損 M9 最小合成培地を用いて、 $\text{OD}_{600} = 1$ となるように菌体濁度を調節することで、定常期の本培養実験を行った。

定常期培養による評価では、600nm における菌体の細胞濁度を UVmini-1240 (Shimadzu) を用いて計測した。先行研究に基づいて 1 OD を 0.3 g/L として、濁度を細胞濃度に変換した (Soini *et al.*, 2008)。細胞外代謝物を測定するため、0.5 - 1 mL の培養液を採取して遠心分離し、培養液上清をフィルターでろ過した。培養液上清に含まれるグルコースの濃度は、UV-vis 検出器、RI 検出器を装備した HPLC Prominence (Shimadzu) を用い、Aminex HPX-87H カラム (Bio-Rad) を使って測定した。HPLC による分析の詳細なメソッドは下記の表 2-5 に示した。

表 2-5 HPLC の Aminex HPX-87H カラムを用いた分析メソッド

カラム	Aminex HPX-87H (Bio Rad)
カラム温度	65°C
移動相	1.5 mM H_2SO_4
流速	0.5 mL/min
測定時間	30 分/サンプル
内部標準物質	5 mM ピメリン酸
検出器	UV-VIS 検出器 (SPD-20A, 210 nm), 示差屈折率検出器 (RID-10A)
フローセルの温度	35°C
サンプル注入量	20 μL

再現性確認のコントロール株と *fbaB* 遺伝子の過剰発現株の 2 株間の比較の定常期培養実験では、培養液上清に含まれるグルコースの濃度は、酵素電極を用いたバイオセンサ (BF-5、王子計測機器株式会社) を用いて測定を行った。測定条件と使用材料は、緩衝液 pH7.0、測定温度 37°C で、測定時のサンプル採取量は 50 μL で、オートサンプラ BF-96AS により 96 穴平底プレートに培養液上清を 200 μL 充填した。バイオセンサの測定

上限のグルコース濃度は 5.4 g/L (30 mmol/L) である。

バイオセンサのグルコースの測定原理は以下の通りである。グルコース電極では、酵素としてグルコースオキシダーゼを用いている。計測原理は、電極の酵素膜中に固定化されたグルコースオキシダーゼが試料中の β -D-グルコースを酸化し、D-グルコノ- σ -ラクトンと過酸化水素を生じる。生成された過酸化水素は、酸化反応を行う電極の白金表面において、過酸化水素が電気分解され ($\text{H}_2\text{O}_2 \Rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- + \text{O}_2$)、その時に出される電流値の変化 (電極出力値) がサンプル中のグルコース濃度の大きさに対応しており、グルコース濃度と電極出力値の検量線を作成することでグルコース濃度の定量測定を行うことができる。

定常期培養による *in vivo* 評価時の FBA 活性を *in vitro* 酵素反応測定によって調べる際、コントロール株、*fbab* 過剰発現株の定常期培養時の培養終了時の菌体ペレットから調製した粗酵素抽出液を用いて、それぞれの株の粗酵素抽出液のもつ FBA 活性の測定を行った。粗酵素抽出液のタンパク質濃度は BCA 法によって、コントロール株のものが 13.7 mg/mL、*fbab* 過剰発現株のものが 13.9 mg/mL であった。反応液 500 μ L 中の粗酵素抽出液のタンパク質濃度は、推定 V_{\max} の検証のための FBA 活性測定時に使用したタンパク質量 (0.128 mg) そろえ、各株の実験は 3 重測定で実施した。

FBA 活性の測定において、NADH の時系列濃度のデータは、0.05 秒ごとに取得した。それぞれ 3 重測定を実施したうち、菌株ごとに傾きが最大となる区間 (付録の Supplementary Figure S3 によりコントロール株では 242 秒から 550 秒、192 から 500 秒、178 秒から 486 秒の 309 秒間、*fbab* 過剰発現株では 210 秒から 314 秒、186 秒から 290 秒、186 秒から 290 秒の 105 秒間) において、NADH の減少の傾きから FBA 活性を算出した。

2.2.11 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

2.2.10 の定常期における培養実験終了後、各一遺伝子過剰発現株の粗酵素抽出液を調製し、目的のタンパク質が過剰発現されているのかを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって確認した。SDS-PAGE に供した粗酵素抽出液の調製には菌体回収時の培養液量の 1/10 容量の Wash Buffer (50 mM Sodium phosphate (pH7.0)、200 mM NaCl、Protease inhibitor cOmplete Tables、Mini EDTA-free、EASY Pack 5 tablets/ 50 mL (Roche)) に 8 M Urea を添加したものを使用した。SDS-PAGE には、市販のゲルとそれに応じた泳動槽を用いた。ゲルは 18 well の e-PAGEL HR HER-R1020L (ATTO CORPORATION)、電気泳動槽は WSE-1150P PageRunAce (ATTO CORPORATION) を用いて、stdGEL 1、21 mA、65 min のプログラム設定で泳動を行った。泳動バッファーは MilliQ 水にて Tris 3.0 g/L、Glycine 14.4 g/L、SDS 1.0 g/L で調製し、500 mL 分を用いた。SDS-PAGE でのサンプルの前処理は、泳動槽へアプライするサンプルのタンパク質濃度が 1 mg/mL 程度になるように調製した。ジチオトレイトール (DTT) 入りの EzApply (AE-1430、EzApply、ATTO) 20 μ L、MilliQ 水 10 μ L、各粗酵素抽出液 10 μ L を混合

し、95°Cで10分間加熱処理を行い、サンプルの上澄み部分を10 μ L泳動に用いた。マーカーはMarker1としてワイドビュープレステインタンパク質マーカーIII 5 μ L/well 245-11 kDa (富士フィルム和光) を、Marker2として Full Range Rainbow Recombinant Protein Molecular weight marker 225-12 kDa RPN800E (Amersham ECL) を用いた。染色はCBB Stain One Super (ナカライテスク) を用いて、洗浄、染色、脱色の工程を行った。MilliQ水で電子レンジ1分間、振盪1分間のサイクルを2回行って洗浄後、MilliQ水を除去した後、CBB Stain One Superを50mL加えて電子レンジに1分間、振盪を2分間で行い染色し、MilliQ水で数回すすいだ後、MilliQ水で電子レンジ1分間、振盪1分間のサイクルを3回繰り返して脱色を行った。脱色後のゲルをデジタルカメラで撮影し、SDS-PAGEの実験結果を保存した。

2.3 結果

2.3.1 仮想実験データによる複数酵素の V_{\max} の同時推定からの律速反応の同定

大腸菌の解糖系について、先行研究の動的代謝モデルを参考に、G6PからPYRまでの解糖系(図2-2)の反応速度論モデルを構築した(Supplementary Table S2, S3)。構築した反応速度論モデルは各酵素の V_{\max} のセットを入力値として、時系列での中間代謝物質の濃度をシミュレーションできる。本研究では、実験的に取得した代謝物質濃度の時系列データを最も説明できるように式2-1の残差二乗和RSSの値を最小にする V_{\max} の値を最適化計算によって推定した(図2-4-2、図2-5-2)。まず、本手法の概念実証のため、反応速度論モデルに答えとする各酵素の V_{\max} のセットを与えて2種類の仮想実験データを生成し、その仮想実験データから答えの V_{\max} の値が正しく推定できるかを調べた。仮想実験1は解糖系前半のPFKの反応を、仮想実験2は解糖系後半のPGKの反応を、それぞれ V_{\max} の値を最も小さい0.01 mmol/mg/minに設定して律速反応としたときの反応速度論モデルの微分方程式を数値積分し、仮想実験データを生成した。

仮想実験1では、解糖系前半PFKの反応の V_{\max} が最も小さいときについて複数酵素の V_{\max} の同時推定を行った。PFKが律速となるように、PFKの V_{\max} を0.01 mmol/mg/min、その他の9つの酵素の V_{\max} を1 mmol/mg/minに設定し、微分方程式を数値積分して時系列データを得て、各サンプリング時点における中間代謝物質濃度を得た。取得した各濃度に変動係数5%のノイズを付加して仮想実験1の時系列の中間代謝物質濃度データとした。仮想実験1の各中間代謝物質濃度の時系列データを図2-4-1に示した。PFKを律速になるように V_{\max} を設定したため、一つ前の反応のPGIの反応で生成されるF6Pが急速に蓄積された。一方、PFKの反応以降の中間代謝物質は緩やか増加し続けた。

この仮想実験1の時系列の中間代謝物質濃度データを説明するように V_{\max} の値をGAによって最適化した。局所的最小値を回避するためRSSに閾値を設け、設定した最大世代時間経過後にも閾値を下回らない場合には、計算を再度やり直した。RSSの値は仮想実験1で0.60を採用した。13回のGAによる最適化の試行のうち、RSSが最小とな

った最適解の V_{\max} を代入した反応速度論モデルの微分方程式を数値積分した結果を図 2-4-1 の右上に示し、13 回の試行で推定された V_{\max} 反応速度論モデルの微分方程式を数値積分したものを重ね合わせた結果は図 2-4-1 の右下に示した。推定した V_{\max} から求められる代謝物質の時系列が仮想実験の時系列データとよく一致していることが示された。

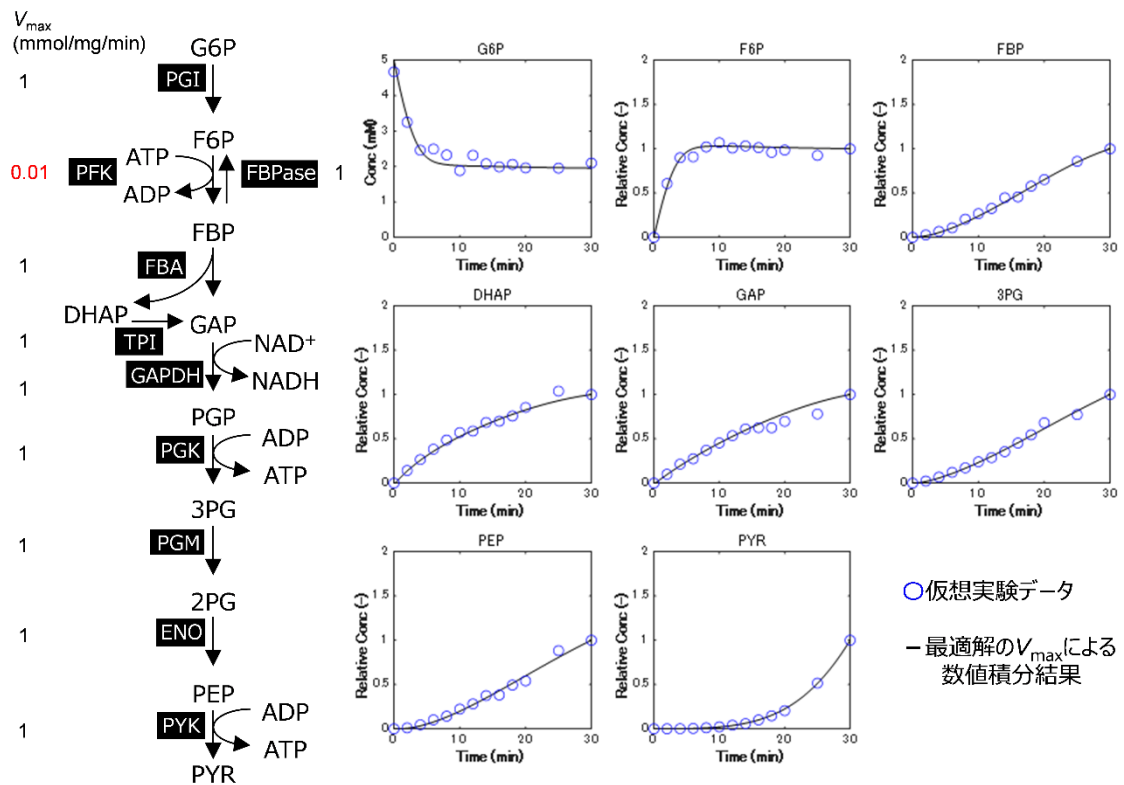


図 2-4-1 解糖系で PFK の V_{\max} の値を最小とした場合 (仮想実験 1) における目的関数に含めた 8 種類の各中間代謝物質の時系列濃度変化

図中の左上に示した解糖系の反応経路に、各酵素の左または右側に示した数字が、仮想実験 1 で設定した各酵素の V_{\max} (mmol/mg/min) で、推定の答えとなる数値である。右上の 8 個の中間代謝物質ごとのグラフは、横軸が時間、縦軸が代謝物質の濃度 (または相対濃度) である。青色の○のシンボルは誤差を含む仮想実験 1 の代謝物質の濃度を示し、黒色の実線は RSS が最小となった GA の試行によって推定された最適解の V_{\max} を代入したときの反応速度論モデルの微分方程式を数値積分した結果を示したものである。

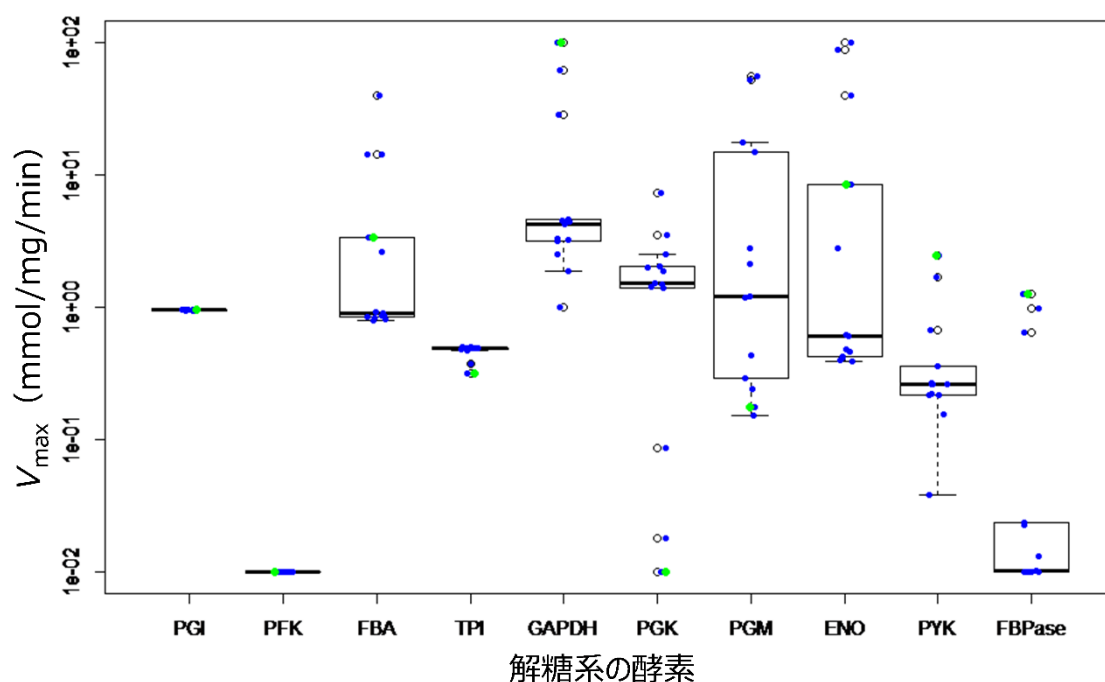


図 2-4-2 仮想実験 1 における解糖系の代謝酵素の V_{\max} 推定結果

横軸に解糖系の G6P から PYR までの反応における酵素を順番に示し、PFK の逆反応の FBPase は最後に示した。縦軸には V_{\max} (mmol/mg/min) を対数で示した。中央太線：中央値。箱の最上端：第 3 四分位数。箱の最下端：第 1 四分位数。○：外れ値。上側のひげ、下側のひげ：(第 1 四分位数 - 1.5x(第 3 四分位数 - 第 1 四分位数)) 以上 (第 3 四分位数 + 1.5x(第 3 四分位数 - 第 1 四分位数)) 以下の範囲で、それぞれ最も大きいデータ点および最も小さいデータ点。箱ひげ図に重ねて、青色の点で 13 回の GA の試行の V_{\max} を示し、緑色の点で最適解の V_{\max} を示した。

図 2-4-2 に、仮想実験 1 において PFK を律速として V_{\max} を経路内の 10 個の酵素のうちで最小の 0.01 mmol/mg/min とし、その他の 9 個の酵素の V_{\max} を一律の 1 mmol/mg/min と仮想した実験から、複数酵素の V_{\max} の同時推定によって律速反応を推定した結果を示した。PFK の V_{\max} は 13 回の GA の試行によってすべての試行での推定結果で 0.01 mmol/mg/min となり、 V_{\max} の推定範囲の幅を非常に狭く限定して推定することができた。さらに、PFK を 10 個の酵素の中で最小の値として推定することができ、PFK を律速反応として同定することができ、正解を得ることができた。また、PGI についても V_{\max} は、平均 0.951 mmol/mg/min、中央値 0.949 mmol/mg/min となり、答えの 1 mmol/mg/min に誤差 4.9 - 5.1% で非常に近く推定できた。PFK を律速反応とした場合の仮想実験 1 による V_{\max} の推定結果では、13 回の GA の試行のうち、最小値の RSS (0.5785) を示した場合 (図 2-4-1 の右上に時系列濃度変化を示したもの) の試行の V_{\max} は、PGI: 0.95、PFK: 0.01、FBA: 3.37、TPI: 0.32、GAPDH: 100.00、PGK: 0.01、PGM: 0.17、ENO: 8.37、PYR: 2.46、FBPase: 1.25 mmol/mg/min となった。

次に、仮想実験 2 では、仮想実験 1 と同様に、解糖系後半の PGK の反応の V_{\max} が最も小さいときについて複数酵素の V_{\max} の同時推定を行った。このときも、局所的最小値を回避するため RSS に閾値を設け、設定した最大世代時間経過後にも閾値を下回らない場合には、計算を再度やり直した。閾値の RSS の値は仮想実験 2 では、0.44 を採用した。

PGK が律速となるように、PGK の V_{\max} を 0.01 mmol/mg/min、その他の 9 つの酵素の V_{\max} を 1 mmol/mg/min に設定し、微分方程式を数値積分して各サンプリング時点における中間代謝物質濃度を得た。さらに、この取得した中間代謝物質の各濃度に変動係数 5% のノイズを付加して仮想実験 2 のデータとした。仮想実験 2 の各中間代謝物質濃度の時系列データを図 2-5-1 に示した。PGK を律速になるように V_{\max} を設定したため、PGK 以降の中間代謝物質の緩やかな蓄積が見られた。

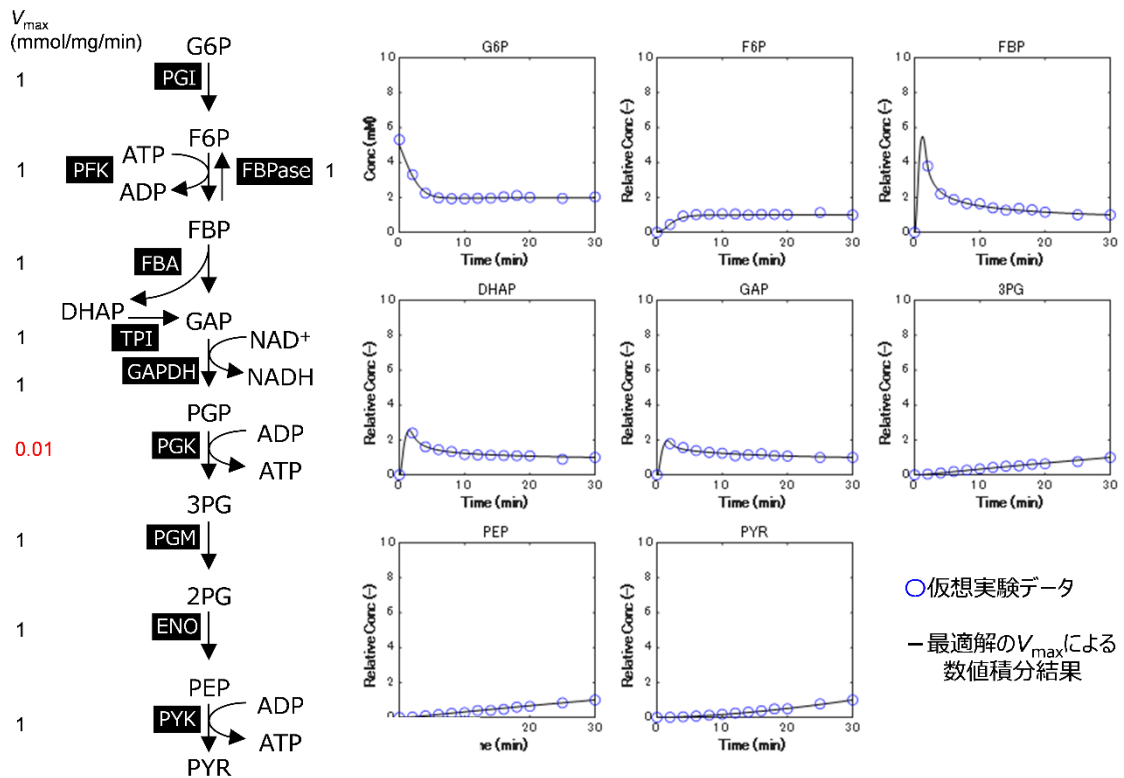


図 2-5-1 解糖系で PGK の V_{\max} の値を最小とした場合 (仮想実験 2) における目的関数に含めた 8 種類の各中間代謝物質の時系列濃度変化

図中の左上に示した解糖系の反応経路に、各酵素名の左または右側に数字で示したのが、仮想実験 2 で設定した各酵素の V_{\max} (mmol/mg/min) で、推定の答えとなる数値である。右上の 8 個の中間代謝物質ごとのグラフは、横軸が時間、縦軸が代謝物質の濃度 (または相対濃度) である。青色○のシンボルは誤差を含む仮想実験 2 の代謝物質の濃度を示し、黒色の実線は RSS が最小となった GA の試行によって推定された V_{\max} を代入したときの反応速度論モデルの微分方程式を数値積分した結果を示したものである。

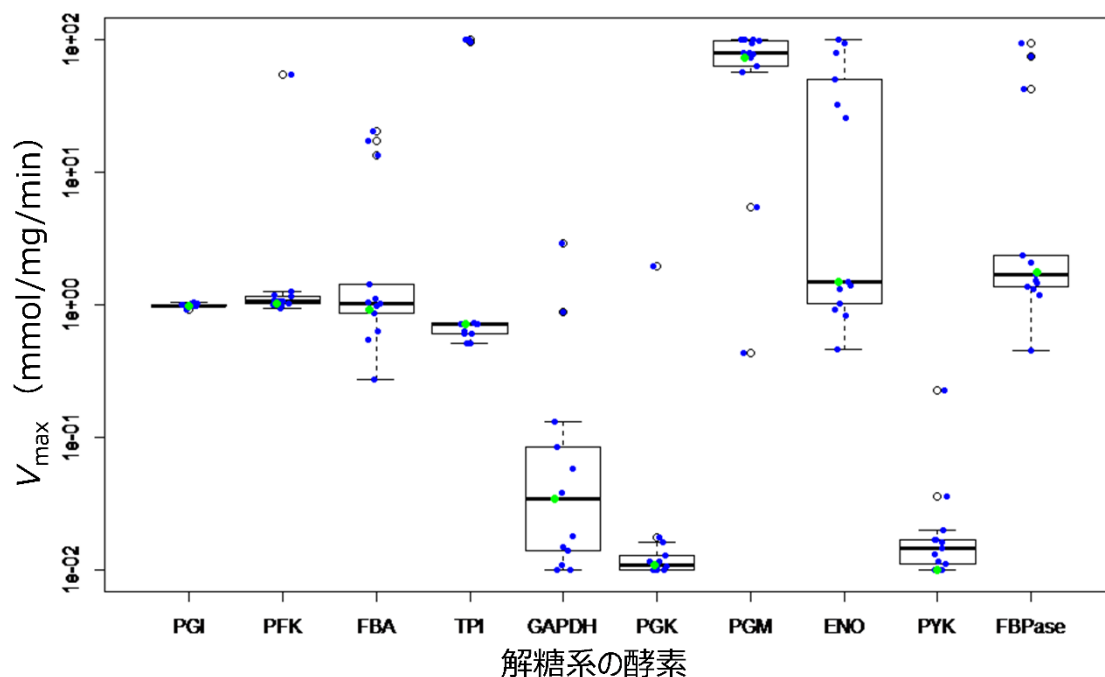


図 2-5-2 仮想実験 2 (PGK の V_{max} が最小となることが答え) における
解糖系の代謝酵素の V_{max} 推定結果

横軸に解糖系の G6P から PYR までの反応における酵素を順番に示し、PFK の逆反応の FBPase は最後に示した。縦軸には V_{max} (mmol/mg/min) を対数で示した。中央太線：中央値。箱の最上端：第 3 四分位数。箱の最下端：第 1 四分位数。○：外れ値。上側のひげ、下側のひげ：(第 1 四分位数 - 1.5x(第 3 四分位数 - 第 1 四分位数)) 以上 (第 3 四分位数 + 1.5x(第 3 四分位数 - 第 1 四分位数)) 以下の範囲で、それぞれ最も大きいデータ点および最も小さいデータ点。箱ひげ図に重ねて、青色の点で 13 回の GA の試行の V_{max} を示し、緑色の点で最適解の V_{max} を示した。

図 2-5-2 より、仮想実験 2 において、PGK を律速反応として V_{max} を経路内の 10 個の酵素のうちで最小の 0.01 mmol/mg/min とし、その他の 9 個の酵素の V_{max} を一律の 1 mmol/mg/min とした場合に、律速反応を推定した結果、PGK の V_{max} は 13 回の GA の試行によって平均値 0.162 mmol/mg/min、中央値 0.011 mmol/mg/min となり、四分位範囲において V_{max} の値の推定範囲の幅を狭く限定して推定することができた。PGK の V_{max} の中央値も答えの 0.01 mmol/mg/min に近く、9 個の酵素の中で最小の値として推定することができた。よって、仮想実験 2 において、PGK を律速反応として同定し、正解を得ることができた。また、PGI について V_{max} は、平均 0.991 mmol/mg/min、中央値 0.985 mmol/mg/min となり、答えの 1 mmol/mg/min に非常に近く推定できた。

PGK を最小の V_{max} をもつ反応の律速反応とした場合の仮想実験 2 による V_{max} の推定結果では、13 回の GA の試行のうち、最小値の RSS (0.3326) を示した場合 (図 2-5-1 に

時系列濃度変化を示したもの) の試行の V_{\max} は、PGI: 0.99、PFK: 1.02、FBA: 0.92、TPI: 0.71 GAPDH: 0.03、PGK: 0.01、PGM: 73.26、ENO: 1.48、PYR: 0.01、FBPase: 1.76 mmol/mg/min となった。PGK 以外にも GAPDH と PYK では低い値の V_{\max} が推定されたが、他の GA の試行回においては、GAPDH や PYK の V_{\max} は大きな値として推定されていたため、PGK を最小の V_{\max} を持つ反応である律速反応として同定することができたと考えられた。

また、第 2 章で選択した複数酵素の V_{\max} 同時推定のための最適化のアルゴリズムに関しては、GA 以外にも逐次二次計画法も検討したが、探索空間の広さのために局所的な最小値に陥ってしまう結果が認められたために使用しなかった。第 2 章の解析では、GA による最適化によって RSS が十分に低い V_{\max} の推定結果が得られることが確認できた。

一方、複数酵素の V_{\max} 同時推定において必要とされた計算時間は、一例では次の通りとなった。PFK を最小の V_{\max} とする仮想実験 1 における GA の 13 回の試行でかかった Matlab の計算時間は、CPU が AMD Ryzen 5 2500U with Radeon Vega Mobile Gfx 2.00 GHz で、メモリが 8.00 GB (6.96 GB 使用可能) のコンピュータを用いた場合、7.25 時間であり、GA の試行 1 回あたりの計算時間は平均 0.56 時間となった。

2.3.2 実際の大腸菌の粗酵素抽出液を用いた *in vitro* 代謝経路解析結果

前節 2.3.1 より、解糖系の代謝酵素の各 V_{\max} を推定し、最小の V_{\max} のものを見出すという仮想実験を実施したところ、最小の V_{\max} の酵素の特定には誤差 3 - 5% で正確に実施でき、仮想実験は成功した。次に実際の大腸菌の粗酵素抽出液を用いる場合の *in vitro* 代謝経路解析に、この V_{\max} の同時推定手法を適用した。グルコースを炭素源とする M9 最小合成培地で培養した大腸菌細胞を使って、粗酵素液を調製した。5 mM G6P、1 mM ATP、5 mM ADP、5 mM NAD⁺ を含む反応液に、終濃度 0.56 mg/mL で粗酵素液を加え、*in vitro* 反応を開始した。この実際の大腸菌の粗酵素抽出液を用いた実験における、解糖系の中間代謝物質の時系列濃度変化を図 2-6 に示した。図 2-6 の各グラフの縦軸の値は、G6P に関しては濃度の絶対値を示しており、それ以外の代謝物質に関しては 30 分目の中間代謝物質の濃度を「1」としたときの相対値を示している。

図 2-6 の各中間代謝物の時系列濃度変化から、基質の G6P が減少し、それ以外の中間代謝物質が増加している様子が観察された。本研究で対象とした解糖系の最終の生産物質である PYR の濃度も増加しており、解糖系が駆動していることがわかった。G6P のグラフの縦軸は濃度の絶対値を示しており、F6P 以降の中間代謝物質のグラフの縦軸は、濃度の相対値を示しているため、G6P の消費の様子と F6P の増加の様子についての単純な比較はできないが、G6P の減少の程度と F6P の増加の程度は前半のサンプリングのタイムポイントで近い傾向を示したため、PGI と PFK の酵素反応は同程度で進行していることが推察された。

一方、F6P の増加の程度に比べて FBP の 2 点目までの増加の様子が急速であったこ

とから、FBP の消費速度が顕著に減少し、すぐに頭打ちとなっており、PFK の反応に比べて、FBA の反応が遅いことが示唆された。またサンプリングポイントの 2 点目までの FBP の蓄積の速度が速いのに比較して、DHAP や GAP の蓄積は緩やかに進行していたことから、TPI の酵素反応については、急速に蓄積が進んだ FBP を消費するのに十分な速度で酵素反応が進んでおり、FBA よりも TPI の酵素反応速度は速いと考えられた。また FBP の蓄積の様子と比較して、FBP より下流の中間代謝物質の蓄積の速度は緩やかであった。他にも、GAP と 3PG との比較では、GAP の増加より 3PG の増加の程度が大きいため、GAPDH、PGK の反応が TPI よりも速く進んでいる可能性が高いと推測できた。PGP 以降の中間代謝物質においては、3PG、PEP、PYR の増加の様子は近い傾向を示したため、PGK と PYK の酵素反応速度は同程度であると予想された。

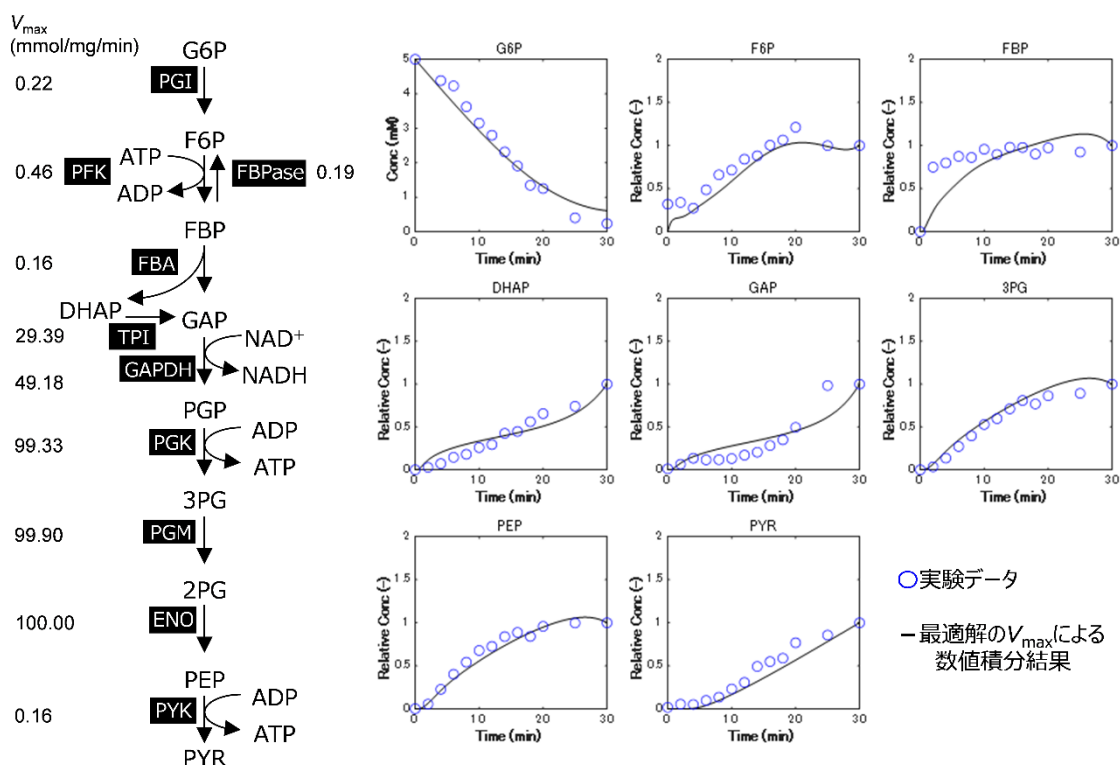


図 2-6 実際の大腸菌の粗酵素抽出液を用いた *in vitro* 代謝経路解析において LC-MS/MS で測定した解糖系の中間代謝物質の時系列濃度変化と推定値の V_{max} を用いた反応速度論モデルからの数値積分結果

左上の図が対象とした解糖系の経路図を示した。経路図の各酵素名の左または右側に数字で示したのが、RSS が最小となった GA の試行における各酵素の V_{max} (mmol/mg/min) の推定値である。右上の 8 個の中間代謝物質ごとのグラフは、横軸が時間、縦軸が代謝物質の濃度 (または相対濃度) である。青色の○のシンボルは *in vitro* 実験データの代謝物質の濃度を示し、黒色の実線は RSS が最小となった GA の試行によって推定された最適解の V_{max} を代入したときの反応速度論モデルの微分方程式を数値積分した結果を示したものである。G6P のグラフの縦軸は濃度の絶対値を示しており、それ以外の中間代謝物質のグラフの縦軸は 30 分目の中間代謝物質の濃度を「1」としたときの相対値を示している。3PG については、実測値は「3PG+2PG」として示した。

2.3.3 実際の大腸菌粗酵素抽出液を用いた *in vitro* 代謝経路解析による律速反応の同定

仮想実験 1 と 2 で使用した大腸菌の解糖系の反応速度論モデルを使用し、前項 2.3.2 で取得した中間代謝物濃度の時系列データを説明するように解糖系の全酵素の V_{max} の値を同時推定した。ここでは、RSS の閾値を 3.6 と設定して、GA による最適化計算を実施した。設定した RSS の閾値を超えた場合は、GA の試行を繰り返し、GA による最適化計算の試行結果を 13 回取得した。13 回の GA の試行のうち RSS が最も小さい値 (RSS = 2.55) の試行で得られた各酵素反応の V_{max} の同時推定結果のセットは、PGI: 0.22、

PFK: 0.46、FBA: 0.16、TPI: 29.39、GAPDH: 49.18、PGK: 99.33、PGM: 99.90、ENO: 100.00、PYK: 0.16、FBPase: 0.19 mmol/mg/min であった。この最適解における各酵素の V_{max} の同時推定結果のセットを使って、反応速度論モデルの微分方程式を数値積分した結果を図 2-6 中の各中間代謝物質のグラフにおいて、黒の実線で示し、青色の○で示した実測データと比較した。実測データのプロットとシミュレーション結果のラインはよく一致しており、実測データをよく説明できる解糖系の全酵素の V_{max} を同時に推定することができた。

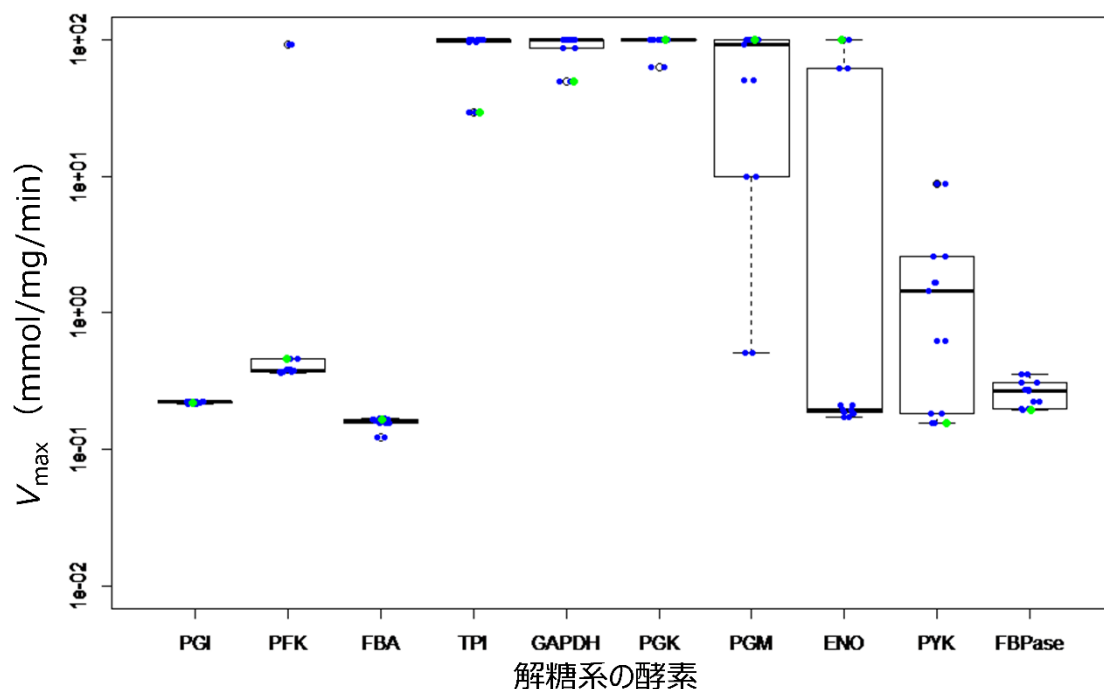


図 2-7 *in vitro* 代謝経路解析結果

横軸に解糖系の G6P から PYR までの反応における酵素を順番に示し、PFK の逆反応の FBPase は最後に示した。縦軸に V_{max} (mmol/mg/min) を対数で示した。中央太線：中央値。箱の最上端：第 3 四分位数。箱の最下端：第 1 四分位数。○：外れ値。上側のひげ、下側のひげ：(第 1 四分位数 - 1.5x(第 3 四分位数 - 第 1 四分位数)) 以上 (第 3 四分位数 + 1.5x(第 3 四分位数 - 第 1 四分位数)) 以下の範囲で、それぞれ最も大きいデータ点および最も小さいデータ点。箱ひげ図に重ねて、青色の点で 13 回の GA の試行の V_{max} を示し、緑色の点で RSS が最も小さい値を示した最適解の V_{max} を示した。

最適化によって取得した各酵素の V_{max} の推定値を図 2-7 に示した。PGI、PFK、FBA、FBPase の V_{max} の推定値は小さい値で収束し、PYK も比較的小さい値に収束したが、TPI、GAPDH、PGK の V_{max} の推定値は大きい値に収束した。一方、PGM と ENO の V_{max} の推定値は四分位範囲が広く、予測の精度は高くなかった。今回の手法開発の目的は、一連の代謝経路における律速反応の同定であるため、低い値をもつ V_{max} が狭い範囲で推定

できたことが重要な意義をもつと考えられた。また、PGM、ENO の V_{\max} の推定値で四分位範囲が広く、予測の精度が高くなかった要因として、以下の2点が考えられた。1点目に、上流のPGKの反応基質となるPGPに関して市販品の定量の基準となる標準品の入手が困難であること、また、2点目に今回のLC-MS/MSの中間代謝物質の定量分析の方法では3PGと2PGの分離が困難であるために3PGの値を3PG+2PGの総量として扱ったことが挙げられる。このため、中間代謝物質濃度の定量分析の結果において、PGMの基質の3PGの量と生成物の2PGの量を実験データに基づいて明確に限定することが難しく、ENOの基質の2PGの量を限定することができなかつたため、結果として推定されるPGMとENOの V_{\max} の範囲が広がったと考えられた。

RSSが最小となる V_{\max} の推定結果では、FBAとPYKは0.16 mmol/mg/minと推定されたが、図2-7の通り、PYKは推定された V_{\max} の範囲が広く、0.16 - 8.76 mmol/mg/minであったのに対し、FBAは V_{\max} が0.12 - 0.17 mmol/mg/minと推定範囲が非常に狭い範囲に限定されており、かつ、最小の値となった。よって、今回実施した*in vitro*代謝経路解析の実験データからの解糖系の10酵素の V_{\max} の推定によって、FBAを解糖系における最小の V_{\max} をもつ反応と推定し、律速反応であると同定した。

また、推定したFBAの V_{\max} の値の妥当性を確認するため、従来法の*in vitro*酵素反応測定法によってFBAの V_{\max} を測定することで検証した。従来法では、過剰量のTPIとGAPDHを加えてFBPを基質とした反応を駆動し、NADHの減少量として吸光度によって測定した(Peng and Shimizu, 2003)。従来法の*in vitro*酵素反応測定によって得られた V_{\max} の値は 0.23 ± 0.01 mmol/mg protein/minであり、本研究で新規に開発した複数酵素の V_{\max} の同時推定法で推定した値(0.12 - 0.17 mmol/mg/min)とほとんど一致していた。

2.3.4 律速反応酵素の添加実験による律速反応同定結果の検証 (*in vitro*)

前項2.3.3の複数酵素の V_{\max} の同時推定によって、解糖系の*in vitro*代謝経路解析の実験データからFBAをPGIの反応以降の解糖系の酵素の中で最小の V_{\max} をもつ反応と推定し、解糖系の律速反応であるとして同定した。もしFBAの反応が律速反応であるならば、この反応を触媒するFBAの酵素を*in vitro*の反応系に追加することで*in vitro*反応系における酵素の存在量を増やせば、FBA以降の反応で生産される代謝物質の濃度が増加し、解糖系全体のフラックスが増加するはずであるため、*in vitro*の反応系によってこの検証を行った。

図2-8に、精製FBAを加えない場合と加えた場合で、それぞれ宿主株の粗酵素抽出液を用いて*in vitro*反応を実施し、340 nmの吸光度計測によりGAPDHの反応によって生成されるNADH濃度の変化をモニタリングした結果を示した。精製FBAは500 μ Lの反応系液量に対して10 U加えた。よって、500 μ Lの反応液中に粗酵素抽出液のFBA活性(0.23 mmol/mg/min)は29.4 Uに相当するため、精製FBA活性の添加によってFBA活性は34%増加した。反応液中のFBA量の増加により、NADHの生産速度が上昇し、

解糖系の反応が進行しやすくなり、*in vitro* の実験において、期待通りに律速反応として同定された FBA の反応が強化され、解糖系全体のフラックスが上昇したことが確認された (図 2-8)。

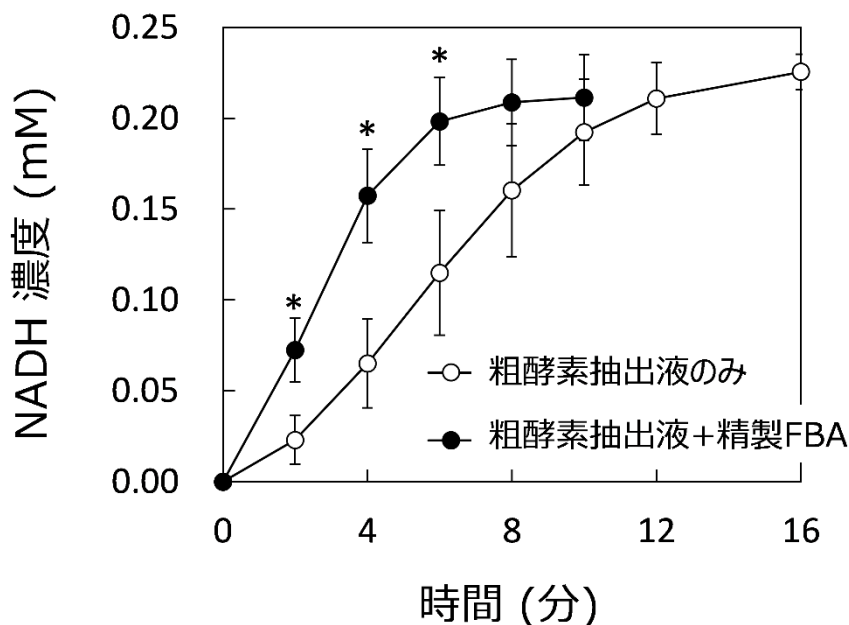


図 2-8 精製 FBA の添加が *in vitro* で再構成した解糖系の駆動に及ぼす影響

横軸に反応液中に酵素液を加えて解糖系の駆動を開始してからの経過時間 (分) を、縦軸にその時の NADH 濃度 (mM) を示した。*を付した時間では、 $p < 0.05$ において両側 t-検定で NADH の濃度に、粗酵素抽出液のみ (○) と粗酵素抽出液+精製 FBA (●) との間に有意差があった。

2.3.5 定常期培養による律速反応同定結果の検証 (*in vivo*)

FBA の酵素量の増加は、実際の細胞内においても解糖系のフラックスを増加させるのだろうか。*in vitro* の実験では、定常期の細胞から回収した粗酵素液を使用した。そこで、次に *in vivo* の実験では、コントロール株と解糖系の各酵素の遺伝子 *pgi*、*pfkA*、*fbaB*、*tpiA*、*gapA*、*pgmA*、*eno*、*pykF* を過剰発現させた株の定常期におけるグルコースの取り込み速度を評価した。この評価では、細胞増殖速度の違いによる影響を排除するために、硫黄欠損の M9 最小合成培地を用いて、細胞増殖を抑えることで定常期の培養状態を実現し、定常期の代謝状態を比較した (図 2-9)。各酵素の過剰発現株において、過剰発現させた酵素反応がもし律速反応であったならば、過剰発現で酵素量を増強させることで、解糖系の進行が進み、その分、定常期の培養状態ではグルコースの取り込みが促進されて、コントロール株に比較してグルコース消費速度が上昇すると考えられた。

本実験では、まず M9 最小培地を用いて各酵素の発現を誘導しながら、各株の菌体細胞を培養した。その後、細胞を回収し、10 g/L のグルコースを炭素源とする硫黄源を含

まない M9 最小合成培地に OD₆₀₀ が 10 となるように細胞を懸濁し、定常期における培養実験を行った。各菌株において目的の酵素を過剰発現できていることを確認するため、24 時間目の細胞から調製した粗酵素抽出液について SDS-PAGE を実施した (図 2-10)。それぞれの菌株由来の粗酵素抽出液について、目的酵素の分子量のバンドを検出することができ、各過剰発現株において、コントロール株よりも目的酵素が過剰に発現されていることを確認した。

コントロール株と各一遺伝子過剰発現株について、定常期培養の 2 - 6 時間目における比グルコース取り込み速度を図 2-9 に示した。コントロール株よりも比グルコース取り込み速度より増加した株は FBA をコードする *fbaB* 遺伝子の過剰発現株だけであり、コントロール株の 1.43 mmol/gDCW/h に対して *fbaB* 過剰発現株では 1.64 mmol/gDCW/h と 1.15 倍に増加した。

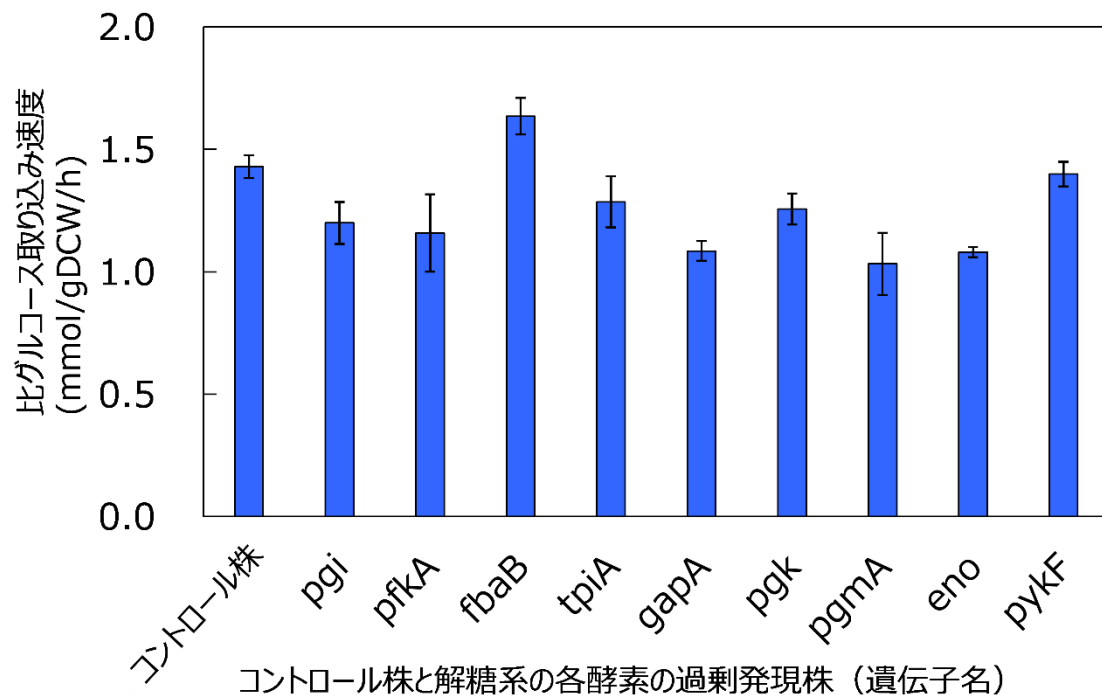


図 2-9 解糖系の各酵素の各過剰発現株の定常期培養における比グルコース取り込み速度

横軸にコントロール株と解糖系の各酵素の過剰発現株 (遺伝子名) を示し、縦軸に比グルコース取り込み速度 (mmol/gDCW/h) を示した。付録の Supplementary Figure S1 の各株の 3 系列の培養開始後 2 - 6 時間目のデータをもとに算出し、各株の培養ごとに対応したエラーバーを付した。グルコース濃度の時間変化の詳細は付録の Supplementary Figure S1 に示した。

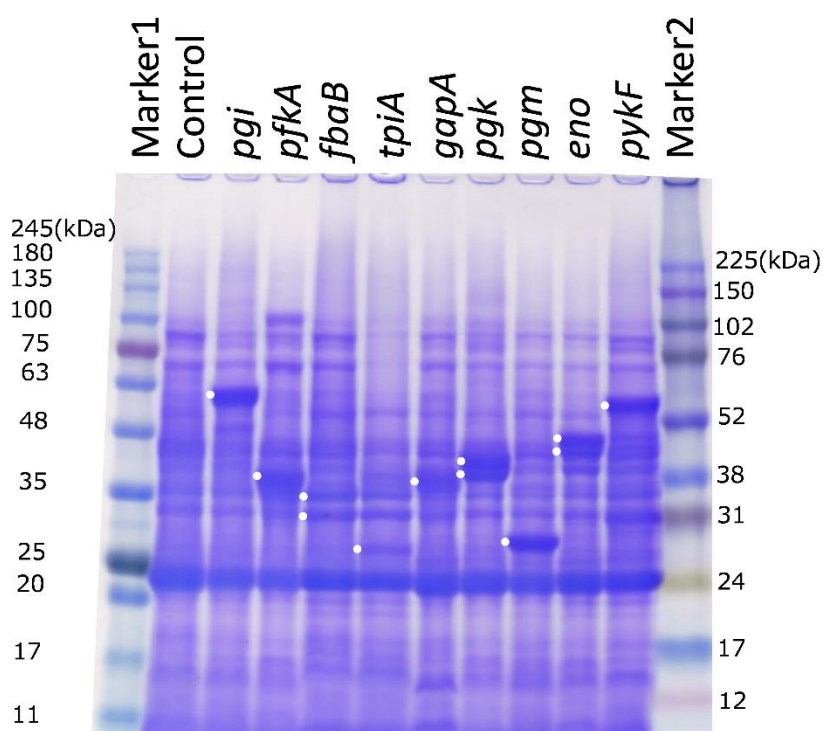


図 2-10 SDS-PAGE による定常期培養時の解糖系の各酵素の過剰発現株の発現状況

白い点で示したものが目的の過剰発現させている酵素のバンドの位置である。粗酵素抽出液の総タンパク質濃度は BCA 法によって定量した。コントロール株のレーンの泳動パターンよりも、各酵素の過剰発現株のレーンの泳動パターンで、Supplementary Table S4 に示した目的の分子量とするバンドの位置に濃く太いバンドが見られた (白点)。

図 2-9 では、FBA の遺伝子である *fbaB* 過剰発現株はコントロール株よりも、14.5% グルコース取り込み速度が上昇していたが、株間の比グルコース取り込み速度の差が小さかったため、菌体濃度を減らすことで、グルコース取り込みを緩やかにし、比グルコース取り込み速度の変化の再現性を確認した (図 2-11)。付録の Supplementary Figure S2 にコントロール株と *fbaB* 過剰発現株の定常期培養における菌体量あたりの培養液上清中の残存グルコース濃度変化、図 2-11 に培養 27 時間目までの比グルコース取り込み速度の比較を示した。

追加の再現性実験では、期待通りに比グルコース取り込み速度はコントロール株の 0.76 ± 0.066 mmol/gDCW/h に対して、*fbaB* 過剰発現株では 1.10 ± 0.046 mmol/gDCW/h となり、比グルコース取り込み速度は *fbaB* 過剰発現株ではコントロール株に比較して 1.44 倍に増加したことが確認できた (図 2-11)。大腸菌の細胞内において、*fbaB* 遺伝子がコードする FBA の酵素量が増加することで代謝経路の律速反応となっていた反応が強化

されて、グルコースをより多く取り込むことができるようになったと考えられた。

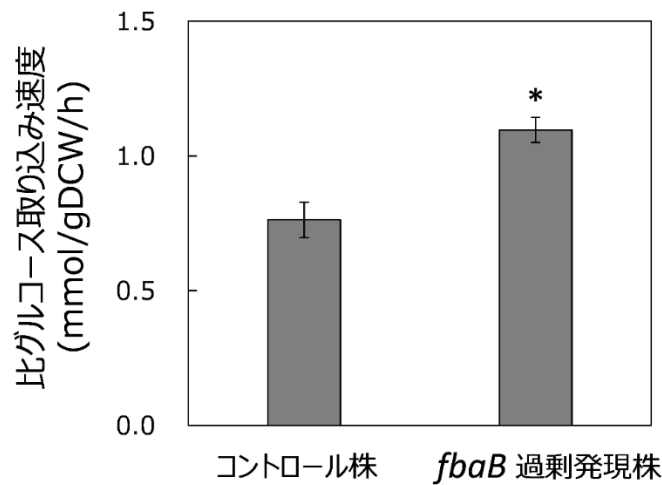


図 2-11 菌体濃度 $OD_{600} = 1$ 、10 g/L グルコースを含む培地条件の定常期培養におけるコントロール株と *fbaB* 過剰発現株の比グルコース取り込み速度の比較

横軸にコントロールの AG1 株と *fbaB* 過剰発現株を示し、縦軸に比グルコース取り込み速度 (mmol/gDCW/h) を示した。付録の Supplementary Figure S2 の 3 系列の培養開始後 27 時間目までのデータをもとに算出し、各系列の培養ごとに対応した誤差範囲を付した。*を付した *fbaB* 過剰発現株では、 $p < 0.05$ において両側 t-検定で NADH の濃度に、コントロール株との間に有意差があった。

さらに、上記の定常期培養の *fbaB* 過剰発現株で律速となっていた FBA 酵素の活性が本当に増大していたのかを確認するために、定常期培養時のコントロール株および *fbaB* 過剰発現株において、FBA 酵素活性を測定した。この実験では、定常期培養 24 時間目に取得した菌体から粗酵素抽出液を調製し、従来法の *in vitro* 酵素反応実験によって FBA 酵素活性を測定した。コントロール株と *fbaB* 過剰発現株の FBA 活性の比較の結果を図 2-12 に示した。コントロール株では 0.052 ± 0.005 mmol/mg/min、*fbaB* 過剰発現株では 0.092 ± 0.005 mmol/mg/min となり、*fbaB* 過剰発現株ではコントロール株の 1.77 倍 FBA 活性が高くなっていた。

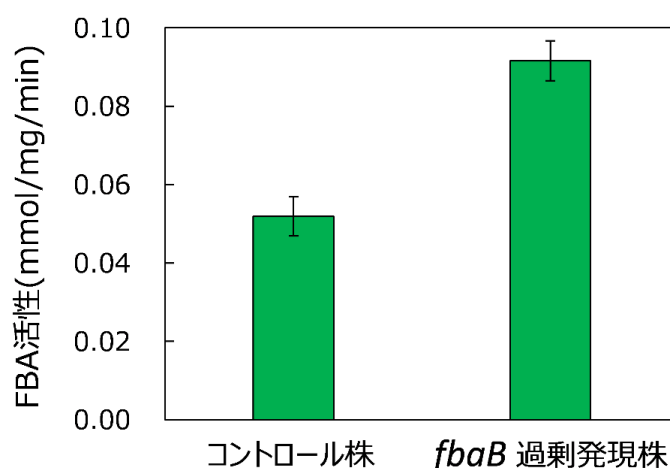


図 2-12 定常培養におけるコントロール株と *fbaB* 過剰発現株の FBA 活性の比較
各株 3 系列で活性を測定した結果を示した。

2.4 考察

微生物を利用した有用物質生産において、代謝経路のフラックスを増加させるには律速反応を同定し、その反応を触媒する酵素の活性を増強することが有効なアプローチである。代謝工学の研究で広く用いられる ^{13}C 代謝フラックス解析は、経路全体の反応速度の分布を明らかにして律速反応の手掛かりを得ることができる方法である。しかしながら、解糖系のような一本道の経路においては、 ^{13}C 代謝フラックス解析では定常状態を仮定するために物質収支の制約条件のもとで全ての酵素反応で同じフラックスの値が求まってしまうため、代謝経路中のどの反応が律速反応であるかを同定するのは本質的に難しい。そこで、本研究では、代謝経路の各反応を触媒する酵素の V_{\max} に着目した。 V_{\max} は反応速度 (フラックス) の上限を表わす酵素のパラメータであり、一連の経路に関わる全ての酵素の V_{\max} を測定することができれば、代謝経路内で V_{\max} が最も小さい反応を律速反応として同定できると考えた。

しかし、 V_{\max} を測定するための従来の *in vitro* 酵素反応測定の手法では、それぞれの酵素ごとに別々の測定系による実験を行う必要があり、代謝経路内の全ての酵素について V_{\max} を測定するには、膨大な手間とコストを必要とする。そこで、本研究では、既に反応速度論モデルが確立している代謝経路を対象として、反応速度論モデルと *in vitro* 代謝経路解析によって、経路に含まれる複数酵素の V_{\max} を同時に推定する方法を開発した。さらに、推定された V_{\max} の結果から、代謝経路内で最小の V_{\max} をもつ反応を律速反応として同定することを目的とした。

対象経路中の複数酵素の V_{\max} 同時推定における最適化手法には、大域的最適化の手法である GA を採用することにした。本章の解析では GA を用いて RSS を小さくすることに成功した。これは、本章で用いた実験データのばらつきが比較的小さかったこと

に起因していると考えられた。

本章では、大腸菌の解糖系を対象として、提案した複数酵素の V_{\max} の同時推定と律速反応の同定を実証した (図 2-6、図 2-7)。大腸菌の実サンプルを使った実験に関して、大腸菌のメタボロームを測定した先行研究 (Ishii *et al.*, 2007) では、解糖系の中間代謝物の中で比較的濃度が高い G6P でも 0.2 mM 程度であることが報告されている。用いた粗酵素抽出液中の G6P について、細胞由来の持ち込みの影響を本研究の反応系に換算すると 0.004 mM となり、*in vitro* 実験において添加した G6P の 5 mM に比べて著しく少ないことから (0.08%以下)、細胞由来の代謝成分の持ち込みの影響は十分に無視できると考えた。

本研究の大腸菌の粗酵素抽出液を用いて *in vitro* 代謝経路解析によって得られた実験データから、解糖系の V_{\max} 解糖系を触媒する酵素の中で PGI、PFK、FBA、PYK について、最適化によって得られた V_{\max} の値は小さいとして推定され、かつその値の推定範囲は、狭い範囲に収束した。一方、それ以外の反応を触媒する酵素の TPI、GAPDH、PGK、PGM、ENO については、 V_{\max} の値は大きな値として推定されたか、または、推定範囲は、狭い範囲に収束しなかった。よって、これら TPI、GAPDH、PGK、PGM、ENO の V_{\max} の値は、中間代謝物質の時系列濃度変化の実験データにあまり影響を及ぼさず、これら 5 つの酵素の V_{\max} がどのような値をとってもある程度は用いた反応速度論モデルが成り立つと考えられた。本研究の目的は、代謝経路中の律速反応を同定することであり、代謝経路内で小さい V_{\max} の値をもつ反応を特定することが重要である。この実験では FBA の V_{\max} が最も小さな値であり、この値は従来法の *in vitro* 酵素反応測定で測定した値とほぼ一致したことから、本手法の妥当性を示すことができた (図 2-12)。

本実験においては、解糖系上流の FBA が最も小さな V_{\max} の値をもつ律速反応として同定された。大腸菌では PFK や PYK が解糖系のフラックスを制御しているアロステリックな調節酵素としてよく知られている (Blangy *et al.*, 1968; Emmerling *et al.*, 1999; Valentini *et al.*, 2000)。PFK や PYK はそれぞれ 3 番目と 4 番目に経路内で小さな V_{\max} として推定されていた (図 2-7)。本当に FBA が解糖系の律速反応になりうるのだろうか。本研究では、*in vitro* と *in vivo* の 2 つ側面からの実験によって FBA が律速反応であることの妥当性を検証した。

in vitro の実験では、粗酵素抽出液に精製 FBA を加えて解糖系の反応が促進するのかわを確認した (図 2-8)。もし FBA が律速反応であるならば、精製 FBA の添加によって解糖系の経路全体のフラックスが増え、生成物の量が増大するはずである。実際に精製 FBA を添加した実験では、解糖系の生産物である NADH (図 2-3) の生産速度が大きく増加した。NADH は解糖系下流の GAPDH で生産される (図 2-3) ため、この結果は、解糖系で GAPDH より上流の代謝経路において存在する律速反応であった反応が強化されて、解糖系のフラックスが上昇したことを示している。

in vivo の実験では、解糖系の各酵素を過剰発現した大腸菌を培養し、細胞増殖を停止した定常期の培養状態においてグルコースの取り込み速度を評価した (図 2-9、図 2-11)。

期待した通り、FBA を過剰発現した細胞においてのみコントロール株に比較してグルコースの取り込み速度が増加した。先行研究において、解糖系の反応を触媒する酵素の過剰発現では、大腸菌の増殖速度は変化しなかったことが報告されている (Kitagawa *et al.*, 2005)。これは増殖期における大腸菌の細胞では、各反応を触媒する酵素の発現量が進化の過程で最適化されているためと考えられた。本研究では、増殖停止期の定常状態における代謝を評価したため、増殖という選択圧にさらされる通常とは異なる代謝状態であり、FBA (Shams *et al.*, 2014; Ziveri *et al.*, 2017) が律速反応になっていたと考えられた。

本研究では、*in vitro* の実験によって時系列の中間代謝物質の濃度変化のデータを取得した。*in vivo* の実験と比べて、*in vitro* の実験のほうが、実験操作や条件設定に利点がある。*in vitro* の実験では、代謝物を測定するためのサンプリングにおいて集菌を必要としないため、迅速なサンプリングや簡便なサンプルの前処理が可能である。また、*in vitro* の実験系では、細胞が直接は取り込むことができないような種類の間代謝物質から代謝経路を駆動することも可能である。これによって、代謝経路を自由に分割することができる。例えば、*in vitro* の実験系で G6P、NAD、ATP を基質に用いれば解糖系を駆動でき、G6P と NADP を基質に用いればペントースリン酸経路を駆動できる。駆動する経路を限定することで、反応速度論モデルを使った最適化の計算範囲を制限でき、最適化計算を容易にすることができる。

また、本研究の複数酵素の V_{max} の同時推定手法では、対象の代謝経路内で前半部分に小さい V_{max} の値を持つ反応が連続した場合には、経路内の後半の酵素の V_{max} の推定精度が低下する可能性がある。そのような場合には、最初の小さい V_{max} の値をもつ反応の生成物を基質とした実験を追加して行い、以降の反応の V_{max} を別途推定するなどの工夫が必要になるであろう。

このように、本研究において提案した、複数酵素の V_{max} の同時推定による律速反応の同定手法は様々な利点を有する一方、課題も存在する。最大の課題は、適用範囲の限界の点である。本研究の適用範囲の限界は、反応速度論モデルが構築されている代謝経路に限定されることである。本研究で取り上げた大腸菌をはじめ、酵母 (Klipp, 2007)、*Clostridium acetobutylicum* (Amador-Noguez *et al.*, 2010; Crown *et al.*, 2011) など、物質生産で用いられている主要な宿主やモデル微生物の中心炭素代謝経路については反応速度論モデルが報告されているが、多くの生物では酵素の反応速度論的な知見が乏しい。

また、大腸菌のグルコース取り込みは、主にヘキソキナーゼではなく、膜結合の酵素複合体によるホストランスフェラーゼシステムによって行われる。このシステムを *in vitro* で再構成することは困難であるため、グルコースの取り込みを本解析に含めることは難しいと考えられる。

本研究は、細胞膜を破碎して調製した粗酵素抽出液を用いて *in vitro* 反応を行っているため、呼吸鎖電子伝達などの細胞膜を介する反応の *in vitro* 再構成も現時点では本研究の対象とはならない。また、酵母の TCA 回路も、細胞内小器官のミトコンドリアに

局在する代謝経路であるため、*in vitro* における代謝経路の再構成は現時点では難しい。他に、タンパク質の *in vitro* 再構成を含む人工細胞の代謝経路の解析は、本研究では対象とはしていない。また、*in vitro* 再構成が可能な代謝経路のうち、それらの代謝経路に含まれる中間代謝物質の濃度が定量分析可能であることも、本研究の適用に必要な条件である。

新たな反応経路を構築することが必要な物質生産株に、本研究の律速反応の同定の手法を適用したい場合はどうすればよいのか。

複数酵素の V_{\max} の同時推定を行いたい代謝経路全体が新規のものであっても、その代謝経路における全ての反応が完全に新規の反応を用いるわけではなく、既存の代謝経路に異種反応を追加しているものであることが多い。経路内で部分的に新規となる反応の反応速度論モデルが近縁種の生物種などで既知か、近似できるものがあれば、反応速度論モデルの組み合わせを工夫することで複数酵素の V_{\max} を同時推定することが可能となると考えられる。よって、本研究の律速反応の同定手法が新規の反応経路をもつ物質生産株の設計と構築にも役立つと考えられる。

2.5 結言

第2章では、*in vitro* 代謝経路解析によって、反応速度論モデルを導入することで、各酵素の V_{\max} の同時推定を行う方法を提案した。さらに、その各反応の V_{\max} の同時推定法によって得られた最小の V_{\max} をもつ反応を律速反応として同定する手法を構築した。

まず初めに、この方法論の妥当性を示すため、解糖系の G6P から PYR に至る直線経路に含まれる全ての酵素について V_{\max} の答えが分かっている状態で、反応速度論モデルに V_{\max} の値を代入することで、モデルの微分方程式の数値積分から時系列の中間代謝物質の濃度データを得て、仮想実験データを生成した。この仮想実験データを使って本提案手法で正解の V_{\max} の値が求まるかどうか、律速反応を同定できるかどうかを検証した。実施した2つの仮想実験について、それぞれ V_{\max} が最も小さい反応を正しく予測することができ、経路の律速反応の同定に使用可能であることを確認した。

次に、大腸菌細胞から得た粗酵素抽出液を利用して *in vitro* 代謝経路解析を実施し、実際の細胞由来のサンプルによって得られた実験データからも代謝経路の複数酵素の V_{\max} を同時に推定できることを示した。本実験では、経路内で最小の V_{\max} の値をとる反応として、FBA が律速反応であることを明らかにした。FBA については、従来の *in vitro* 酵素反応測定によって V_{\max} の値を測定して検証することで、本提案手法における V_{\max} の推定が妥当であることを確認した。

本提案手法は反応速度論モデルの存在を前提とするため、反応速度論モデルが存在するよく研究されているモデル微生物、大腸菌や酵母、*Clostridium acetobutylicum* などの主要な代謝経路について実施することができる。また、興味の対象について、反応速度論モデルさえ構築することができれば応用可能であるため、新規の物質生産株に

おける有効な酵素の発現強化箇所を探索する目的としても活用できるに違いない。本手法は、代謝経路の律速反応を同定するための代謝工学の新しいツールとして有用であり、代謝改変の基盤技術の1つとして役立つと期待される。

第3章 ^{13}C 代謝フラックス解析と *in vitro* 酵素反応測定 および *in vitro* 代謝経路解析による律速反応の同定

3.1 緒言

第2章では、反応速度論モデルが既知の代謝経路について、*in vitro* 酵素反応実験で取得した中間代謝物質濃度の時系列データを利用して各酵素の V_{\max} を推定し、経路内で最小の V_{\max} を持つ反応を律速反応として同定する手法を開発した。第3章では、経路全体のフラックス分布を推定する ^{13}C 代謝フラックス解析と第2章で開発した *in vitro* 代謝経路解析を利用して、フェノールによって大腸菌が増殖阻害を受ける際の代謝の影響を調べた。

フェノールはポリカーボネートやエポキシ樹脂、フェノール樹脂、アニリンの合成原料など多様な用途で利用される有用化合物である (Schmidt, 2005)。現在は、化石資源に由来するベンゼンを原料に用いたクメン法によって、そのほとんどが工業的に生産されているが (Wierckx *et al.*, 2005)、環境問題に配慮した持続可能な発展のためには、再生可能バイオマス資源からの微生物による発酵生産が求められている。微生物の代謝を用いた物質生産では、フェノールはアミノ酸の一種であるチロシンからチロシンフェノールリアーゼという酵素によって生合成される。チロシンフェノールリアーゼは *Bacterium coli phenologenes*, *Pantoea agglomerans*, *Clostridium tetanomorphum* などの微生物種において発見されている (Brot *et al.*, 1965; Kumagai *et al.*, 1970a; Kumagai *et al.*, 1970b)。広く工業的にバイオプロダクションの宿主に用いられる大腸菌に *P. agglomerans* 由来のチロシンフェノールリアーゼを導入した研究も報告されている (Kim *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2016)。しかし、フェノールは、宿主となる大腸菌に対して毒性があり、細胞内代謝を用いてフェノールを生産させることで大腸菌の増殖を低下させるため (Ramos *et al.*, 2002)、フェノールの生産性が低いという課題がある (Kim *et al.*, 2014)。

このように、フェノールを含むシクロヘキサン、*n*-ペンタン、*n*-キシレンなど様々な有機溶剤は、大腸菌に対して毒性をもち、この毒性は有機溶剤の極性指標 ($\log P_{ow}$) と相関関係にあることが知られている (Aono *et al.*, 1994)。一般的に、 P_{ow} 対数値は低いほど微生物への毒性が強く、フェノールの P_{ow} 対数値は 1.46 (Verschueren, 1983) であり、有機溶剤のなかで非常に高い値である。一方で、フェノールの存在下で大腸菌の呼吸活性は低下しないため (Keweloh *et al.*, 1990)、大腸菌がフェノール存在下で増殖が低下する原因は膜の損傷による呼吸鎖の阻害が原因ではなく (Keweloh *et al.*, 1991)、フェノールによって代謝経路のどこかの反応で阻害を受けて、その反応が律速反応となって細胞の再構成が抑制されていることが推察された。

大腸菌を宿主としたフェノール生産においては、生産したフェノールが宿主の代謝に及ぼす有害な影響を回避することが、フェノールの高生産性を実現するための課題であ

る。そのため、フェノール存在下において大腸菌の代謝経路内の酵素の V_{\max} が低下する反応を特定し、代謝経路の律速反応を同定することができれば、フェノールの高生産のための戦略を提案できると考えた。

フェノールが大腸菌の代謝に影響を及ぼす作用機序は分かっていないため、中心炭素代謝全体を考慮する必要がある。中心炭素代謝経路には解糖系の直線経路だけでなく、ペントースリン酸経路や TCA 回路など分岐合流を含む複雑な経路が含まれる。そこで本研究では、 ^{13}C 代謝フラックス解析によって中心炭素代謝経路全体のフラックス分布を明らかにし、分岐部位に着目して律速反応を同定する。次に、フラックス分布だけでは分からない分岐までの直線経路である中心炭素代謝経路前半の解糖系について、第2章で開発した、反応速度論モデルを導入した *in vitro* 代謝経路解析による複数酵素の V_{\max} の同時推定法を使って、フェノール添加時の解糖系における律速反応を同定し、フェノール添加なしの条件から律速反応が変化するかどうかを調べた。

3.2 手法と材料

3.2.1 使用した大腸菌株

本研究では、大腸菌野生株 BW25113 株を使用した。また、第2章の「反応速度論モデルと *in vitro* 酵素反応測定を用いた律速反応同定法の開発」を踏まえた解糖系を対象とする代謝変動の観察のための律速反応の同定における実験では、大腸菌の ASKA clone (Kitagawa *et al.*, 2005) の宿主株 AG1 株を用いた。TCA 回路の酵素の検証実験には、ASKA clone のクエン酸シンターゼの遺伝子の過剰発現株の *gltA+* 株を用い、フェノールの添加と酢酸の排出の関係の検討のための培養には、酢酸の生産に関わる *pta* 遺伝子 (Castaño-Cerezo *et al.*, 2009) の欠損株の Δpta 株を用いた。使用した株を表 3-1 に示した。

表 3-1 使用した菌株とその遺伝子型

菌株	遺伝子型	Reference
BW25113 (野生株)	$F^{\Delta} \Delta(\text{araD-araB})567 \Delta(\text{rhaD-rhaB})568 \Delta\text{lacZ4787}$ $(::\text{rrnB-3}) \text{hsdR514 rph-1}$	Grenier <i>et al.</i> , 2014
AG1	$\text{recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17} (r_{\text{K}^-} m_{\text{K}^+}) \text{supE44}$ $\text{relA1, pCA24N, -gfp}$	Kitagawa <i>et al.</i> , 2005
<i>gltA+</i>	AG1 (ME5305) $\text{recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17} (r_{\text{K}^-}$ $/m_{\text{K}^+}) \text{supE44 relA1}$ with a pCA24N plasmid carrying the <i>gltA</i>	Kitagawa <i>et al.</i> , 2005
Δpta	BW25113 $\Delta pta::\text{tetA}$	Baba <i>et al.</i> , 2006

3.2.2 培養条件

試験管を用いた培養評価では、前培養は 5 mL の 4 g/L グルコースを含む M9 最小合成培地を用いて、37°C、150 rpm で一晩培養した。本培養は L 字型試験管にて 5 mL の M9 最小合成培地を用いて、37°C、70 rpm で培養した。培養には濁度計測機能付き小型振盪培養装置 (TVS062CA, Advantec) を用いて、5 分ごとに 660 nm の OD を測定した。初期 OD は 0.05 になるように植菌し、フェノールは 0 - 0.16% (v/v) になるように加えた。

¹³C 代謝フラックス解析のための培養では、本培養はバツフル付き 200 mL 容フラスコに 50 mL の 4 g/L [¹³C]グルコースを含む M9 最小合成培地を用い、37°C、200 rpm で行った。初期 OD は 0.05 になるように植菌し、フェノールは 0%、0.1%、0.15% (v/v) になるように加えた。

本研究では、グルコース 4 g/L、Na₂HPO₄ · 12 H₂O 16.90 g/L、KH₂PO₄ 3.09 g/L、NaCl 0.50 g/L、NH₄Cl 1.00 g/L、MgSO₄ · 7 H₂O 0.25 g/L、MnCl₂ · 4 H₂O 1 mg/L、ZnCl₂ 1.7 mg/L、CuCl₂ · 2 H₂O 0.43 mg/L、CoCl₂ · 6 H₂O 0.60 mg/L、Na₂MoO₄ · 2 H₂O 0.60 mg/L、FeCl₃ 8.1 mg/L を含む M9 最小合成培地を使用して、培養評価を行った。*gltA*+株の菌体取得を目的としたフラスコによる培養では、40 µg/mL のヒスチジンと 25 µg/mL のクロラムフェニコールを加えた。フラスコによる培養は全て 3 系列で行った。

また、*in vitro* 代謝経路解析のための培養条件は、以下の通り実施した。25 µg/mL のクロラムフェニコールを含む LB 液体培地 4 mL を試験管で、37°C、150 rpm にて一晩前培養を行った後、バツフル付き 200 mL フラスコに、4 g/L のグルコースを炭素源として含む M9 最小合成培地 50 mL に、40 µg/mL のヒスチジンと 25 µg/mL のクロラムフェニコールを加え、初期 OD₆₀₀ = 0.05 となるように植菌した。BioShaker BR-43FL (TAITEC) を用いて 37°C、150 rpm にて培養開始後 6 時間後に Isopropyl-β-D(-)-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 100 µM になるように添加し、さらに 16 時間培養を行った。この定常期条件にて 12 mL ずつ分注し、4°C、10,000 rpm、10 分間の条件で遠心分離することによって菌体ペレットを得た。菌体ペレットは使用時まで -80°C にて保存した。

3.2.3 菌体濁度の測定と培養液上清の分析

フラスコによる培養サンプルの測定では、600 nm における濁度を UVmini-1240 (Shimadzu) を用いて計測した。先行研究に基づいて 1 OD₆₀₀ を 0.3 g/L として、濁度を細胞濃度に変換した (Soini *et al.*, 2008)。培養サンプルの細胞外代謝物質の濃度を測定するため、サンプリング時間ごとに 1 mL の培養液を採取し、遠心分離し、培養液上清をフィルターでろ過して保存した。その培養液上清に含まれるグルコース、酢酸、ギ酸、エタノール、乳酸、コハク酸の濃度は、UV-VIS 検出器、RI 検出器を装備した HPLC Prominence (Shimadzu) を用い、Aminex HPX-87H カラム (Bio-Rad) を使って測定した。HPLC の分析メソッドを表 3-2 に示した。

表 3-2 Aminex HPX-87H カラムによる分析メソッド

カラム	Aminex HPX-87H (Bio Rad)
カラム温度	65°C
移動相	1.5 mM H ₂ SO ₄
流速	0.5 mL/min
測定時間	70 分/サンプル
内部標準物質	10 mM イソ吉草酸
検出器	UV-VIS 検出器 (SPD-20A、210 nm)、 示差屈折率検出器 (RID-10A)
フローセルの温度	35°C
サンプル注入量	20 µL

3.2.4 GC/MS によるタンパク質由来アミノ酸の質量分析

¹³C 代謝フラックス解析のため、タンパク質由来アミノ酸の質量分析を行った。各フェノール濃度の条件で、培養開始から OD₆₀₀ = 0.8 - 1 付近となった適切な時間に OD₆₀₀×mL = 5 分の培養液を 15 mL 容のファルコンチューブに取り、4°C、8000 rpm、10 分間遠心分離によって菌体細胞を回収し、使用時まで -80°C で保存した。タンパク質の加水分解には、フェノール濃度 0% の培養開始後 5 時間目、フェノール濃度 0.1% の培養開始後 6 時間目、フェノール濃度 0.15% の培養開始後 8 時間目のサンプルを使用した。-80°C で保存した菌体ペレットを 2 mL の 0.9% 食塩水で懸濁後 10 mL にメスアップしてよく懸濁し、4°C、8000 rpm、10 - 12 分間遠心分離を行うという洗浄の操作を 2 回繰り返した。洗浄後、菌体を 1 mL の 6 M 塩酸に懸濁し、凍結アンプル瓶に移して密栓し、ヒートブロック恒温槽 (Dry Thermo Unit DTU-1C, TAITEC) で 110°C、18 時間加熱した。加水分解物は 0.45 µm、13 mm のコスモナイスフィルター W (水系) (ナカライテスク) によって不溶物を取り除いた。約 60 µL の加水分解物に 600 µM シクロロイシン 10 µL を加え、濃縮遠心機 CC-105 (TOMY) にて 65°C で減圧乾固した。

タンパク質由来アミノ酸の誘導体化には、*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% TBDMCS) による *tert*-ブチルジメチルシリル化を用いた。完全に乾燥させた加水分解後のサンプルに、50 µL アセトニトリルと 50 µL MTBSTFA + 1% TBDMCS を加えて、密栓し、タッピングによって混和後、105°C で常温から 1.5 時間ヒートブロック上で反応させた。誘導体化の反応後、室温で 60 分クーリングし、15,000 rpm、5 分、RT (23°C) で遠心して上清のみを採取し、GC/MS 分析に用いた。

GC/MS と DB-5MS カラム (Agilent Technologies) を使って、各アミノ酸の質量同位体分布を測定した。サンプルの前処理や測定は先行研究に従った (Okahashi *et al.*, 2017)。詳細な分析条件は下記の表 3-3 に、GC-MS 分析のメソッドは下記の表 3-4 に示した。

表 3-3 GC-MS 装置の分析条件

装置	Agilent 7890 GC, Agilent 5975 MSD (Agilent Technologies) DB-5MS+DG (Agilent Technologies)
カラム	長さ 30m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μ m, (5%Phenyl)- 95%Methylpolysiloxane
ライナー	Ultra Inert Inlet Liners 5190-2295 (Agilent Technologies)
注入口温度	250°C
キャリアガス	ヘリウム 1 mL/min
イオン化法	電子イオン化
イオン化電圧	70 eV

表 3-4 GC-MS による分析メソッド

注入方法	スプリットモード (10:1)
注入量	1 μ L
昇温条件	150°C (2 min)~3°C/min~270°C~10°C/min~300°C (5 min)
イオン源/四重極温度	250°C/150°C
分析モード	SIM モード

3.2.5 ^{13}C 代謝フラックス解析

3.2.4 で測定したアミノ酸の質量同位体分布は、代謝経路のフラックス分布を反映したものであるが、フラックス分布と質量同位体分布の関係は複雑であるため、直接フラックス分布に変換することはできない。そこで、 ^{13}C 代謝フラックス解析では、任意のフラックス分布を入力として、そのフラックス分布において代謝経路の各反応を通じて炭素原子がアミノ酸に変換される過程を計算するためのモデルを構築し、最適化計算によって実測した質量同位体分布を説明するフラックス分布を推定する。

大腸菌の過去の ^{13}C 代謝フラックス解析に基づき、解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路、補充経路、ED 経路、発酵経路、グリオキシル酸経路を含む中枢代謝経路の反応を考慮した (Okahashi *et al.*, 2017; Wada *et al.*, 2017)。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を乗じることで算出した (Ingraham *et al.*, 1983)。反応による炭素原子の移動は、各代謝物質の ^{13}C 標識割合として Elementary Metabolite Unit (EMU) に基づいてモデル化した (Antoniewicz *et al.*, 2007)。反応や炭素原子の移動の情報を Supplementary Table S5 にまとめた。フラックス分布から計算されるアミノ酸の質量同位体分布と実測値の残差二乗和 (RSS) を最小化するように、MATLAB の非線形最適化ソルバーの *fmincon* を用いてフラックス分布を最適化した (式 3-1)。質量同位体分布の計算値と実測値の差は χ^2 検定によって評価した。

$$\text{Minimize RSS} = \sum_{i=1}^n \left(\frac{MID_i^{\text{measured}} - MID_i^{\text{simulated}}}{SD_i} \right)^2 + \sum_{j=1}^m \left(\frac{r_j^{\text{measured}} - r_j^{\text{simulated}}}{SD_j} \right)^2 \quad (\text{式 3-1})$$

MID_i^{measured} と $MID_i^{\text{simulated}}$ は、i 番目のアミノ酸について実測した質量同位体分布と、モデルに入力したフラックス分布から計算された質量同位体分布を表わす。 r_j^{measured} と $r_j^{\text{simulated}}$ は、j 番目の測定可能な細胞外フラックスについて、培養液の分析により実測した値と、フラックス分布から計算した値を表わす。標準偏差 (SD) は GC/MS の測定結果において 0.01 に設定した (Wada *et al.*, 2017)。アミノ酸の質量同位体分布は、代謝物質中に天然の割合で存在する水素、酸素、窒素、ケイ素の天然同位体の影響を考慮して、van Winden らの 2002 年の報告での方法に従って除去することで補正した (van Winden *et al.*, 2002)。それぞれのフラックスの 95%信頼区間はグリッドサーチ法により評価した (Antoniewicz *et al.*, 2006)。フラックスの 95%信頼区間を求める RSS の許容範囲は次の式 3-2 によって与えられる。

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

v_{opt} は式 3-1 を用いた最適化計算によって求めたフラックス分布、 n はフラックスの推定に用いた質量同位体分布のデータ数、 p はモデルの自由度を表わす。全ての計算は MATLAB 2018a (MathWorks) と OpenMebius (Kajihata *et al.*, 2014) を用いて実施した。

3.2.6 粗酵素抽出液の調製とタンパク質濃度定量

第 3 章では ^{13}C 代謝フラックス解析によって分岐のある経路である中心炭素代謝経路上の各反応のフラックスを調べた。その後、律速反応と推定された酵素や対照とすることができる酵素の活性 V_{max} を *in vitro* 酵素反応測定によって調べることで検証を実施した。その *in vitro* 酵素反応測定のために、粗酵素抽出液を調製し、粗酵素抽出液のタンパク質濃度の定量を行った。

in vitro 酵素反応測定によるクエン酸シンターゼおよび PGI の活性測定に供した粗酵素抽出液の調製は以下の通りである。培養液 1 mL から回収した菌体を 0.1M Tris-HCl pH8.2 に懸濁し、UD-100 (TOMY) を使い、Out level 50 で ON/OFF を 10 回繰り返して破碎した。遠心分離 (4°C、20,000×g、30 min) によりデブリを除去し、粗酵素抽出液を活性測定に用いた。粗抽出液のタンパク質濃度は nanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて吸光度 280 nm を測定し、算出した。

また、代謝変動の観察のための律速反応同定において *in vitro* 代謝経路解析に供した粗酵素抽出液の調製は次の通りである。粗酵素抽出液の調製には、氷上にて、菌体の回

収液量の 1/30 量の Wash Buffer (50 mM Sodium phosphate (pH7.0)、200 mM NaCl、Protease inhibitor cOmplete Tables、Mini EDTA-free、EASY Pack 5 tablets/ 50mL (Roche)) で懸濁し、1.5mL エッペンチューブに移して、4°C、15000×g、5 分間遠心分離を行って、上清を除き、培地成分を洗浄・除去した。再び、氷上で、菌体回収量の 1/30 量の Wash Buffer を加え、懸濁後、BIORUPTOR (COSMOBIO Co., LTD.) にて、レベル High で 5 秒または 30 秒おきに 6 分間氷水中で超音波処理を行った。その後、4°C、20,000×g、20 分間の遠心分離後のサンプルの上清を粗酵素抽出液として 4°C で保存した。粗酵素抽出液は調製後 4°C で保存して、調製後の *in vitro* 酵素反応測定または *in vitro* 代謝経路解析への使用はできるだけ早くすることとし、使用期間は最長でも調製後 3 日以内とした。

粗酵素抽出液の総タンパク質量は Pierce BCA Protein Assay Kit にて BSA を標準溶液として検量線を作成し、570 nm の吸光度を測定することで算出した。吸光測定に用いたプレートリーダーは、Wallac 1420 Workstation を搭載した ARVO MX 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer Precisely) である。

3.2.7 従来法の *in vitro* 酵素反応測定

¹³C 代謝フラックス解析によって律速反応であると推定された酵素のクエン酸シンターゼや、対照とすることができる酵素の PGI、また、PYK の反応について、従来法の *in vitro* 酵素反応測定を実施して酵素の活性を調べることで評価を行った。

クエン酸シンターゼの活性は、反応によって生じる CoA の SH 基を DTNB によって比色として検出するエルマン法によって測定した (Srere, 1969)。DTNB の発色は 412 nm における吸光度を UVmini-1240 (Shimadzu) を用いて測定した。粗酵素抽出液 10 μL、MilliQ 水 190 μL、10 mM Acetyl-CoA 12.5 μL、1 mM 5-5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic Acid) (DTNB) in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.2) 25 μL を加えた。必要に応じて、反応液にフェノールを 0.1%、0.15%、0.3% (v/v) の濃度で加えた。反応は室温で 5 分静置した後、10 mM Oxaloacetate in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.2) 12.5 μL を加えて開始し、10 秒ごとに 412 nm の吸光度を UVmini-1240 (Shimadzu) を用いて測定した。クエン酸シンターゼの活性の単位は、特定の条件下において、1 分間に 1 μmol の生成物を産生するために必要な酵素量を 1 unit と定義した。

PGI は G6P から F6P への代謝反応を触媒する酵素である。直接 G6P や F6P の濃度の時間変化を測定することは困難であるため、G6P がペントースリン酸経路でグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) によって分解されて NADP⁺ から NADPH を生じる反応をカップリングさせて NADPH の吸光波長である 340 nm の吸光度を測定することで *in vitro* 酵素反応測定実験を行った。PGI の酵素活性の測定 (Salas *et al.*, 1965; Peng and Shimizu, 2003) の手順は以下の通りである。12 μL の粗酵素抽出液と MilliQ 水または必要濃度のフェノールを溶解させた MilliQ 水 318 μL を予め 5 分間 30°C でインキュベートさせておく。ディスポーザブルキュベットに 1 M Tris-HCl pH7.8 50 μL、100 mM MgCl₂ 20 μL、10 mM NADP⁺ 25 μL、40 mM F6P 25 μL、10 U/mL G6PDH 50 μL を加え、

インキュベートしておいた粗酵素抽出液の混合液を加えてピペッティングにより混和し、500 μL の反応系で反応を開始し、10 秒ごとに 340 nm の吸光度測定を行った。PGI の活性単位は、特定の条件下において、1 分間に 1 μmol の NADPH を産生するために必要な酵素量を 1 unit と定義して、PGI の活性を算出した。

PYK は PEP から PYR への代謝反応を触媒する酵素である。直接 PEP や PYR の濃度の時間変化を迅速に定量測定することは困難であるため、乳酸デヒドロゲナーゼによって PYR と NADH が乳酸と NAD^+ に代謝される反応をカップリングさせて NADH の濃度の減少の様子を測定することで活性の変化を調べた (Peng and Shimizu, 2003)。NADH の濃度の減少が直接的な結果であるが、グラフとしての分かりやすさを考慮してマイナスの変化をプラスの変化と置き換えて、実験を 3 重で行い、結果の図に示した (Supplementary Figure S4)。フェノールの有無による PYK の酵素活性の測定の手順は以下の通りである。反応液の全量は 500 μL とした。反応液バッファーとして 0.5M Tris-HCl pH7.5 100 μL 、20mM DTT 25 μL 、200 mM KCl 25 μL 、250 mM MgCl_2 30 μL 、MilliQ 水または 0.15% フェノール水溶液 125 μL を混和して、予め 37°C で 5 分間加温した。その後、100 mM ADP 25 μL 、10 mM PEP 25 μL 、10 mM NADH 12.5 μL を混合液として作成後に加えてピペッティングにより混和した。さらに、6.53 U/mL の乳酸デヒドロゲナーゼ 100 μL と定常期の AG1 株から得た粗酵素抽出液 13.2 mg/mL を 32.5 μL を予め混合して氷上に静置していたものを迅速に加えて反応を開始し、0.05 秒おきに 340 nm の吸光度を測定し、NADH 濃度の時間変化を調べた。本測定による PYK の酵素活性は NADH が 1 分間あたりに 1 μmol 変化するときを 1 unit と定義した。

クエン酸シンターゼ (Srere, 1969) および PGI (Salas *et al.*, 1965, Peng and Shimizu, 2003) の *in vitro* 酵素反応測定には、それぞれ 412 nm、および、340 nm の吸光度測定に UVmini-1240 (Shimadzu) を用いた。DTNB の 412 nm におけるモル分子吸光係数は 13.6 L/mmol/cm であり、NADPH の 340 nm におけるモル分子吸光係数は、6.2 L/mmol/cm とした。PYK の *in vitro* 酵素反応測定には、紫外可視近赤外分光光度計 V-750 (JASCO ENGINEERING) を用いて、時間変化測定プログラムによって経時的に 340 nm の吸光度を測定することで NADH 濃度の生産を時系列で計測した。NADH の 340 nm におけるモル分子吸光計数は 6.22 L/mmol/cm とした。

3.2.8 フェノール添加条件における代謝変動の観察のための *in vitro* 代謝経路解析

^{13}C 代謝フラックス解析から得られたフラックス分布だけでは分からない分岐までの直線経路である中心炭素代謝経路前半の解糖系を対象に、フェノール添加によって V_{\max} が低下した反応がないかや、経路の律速反応に変化がないかを調べた。この調査のために、第 2 章で開発した *in vitro* 代謝経路解析による複数酵素の V_{\max} 同時推定からの律速反応の同定手法を用いた。第 3 章で実施した *in vitro* 代謝経路解析の実施内容を下記に示した。

反応液の緩衝液の組成は、先行研究に基づいて 50 mM NH_4HCO_3 、2 mM Na_2HPO_4 ・

12H₂O、0.4 mM MOPS、2.5 mM MgCl₂とした (Bujara *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2017)。基質として、1 mM ATP、5 mM ADP、5 mM NAD⁺、5 mM G6P を加えた。

第3章の *in vitro* 代謝経路解析では、フェノールの添加による解糖系の律速反応を同定して代謝変動を観察することを目的としたため、必要に応じて、*in vitro* 反応液の希釈に用いた MilliQ 水の代わりに 0.15% のフェノール水溶液を用いた。時系列でサンプリングを行うための *in vitro* 反応液の混合調製は下記の通りに行った。500 mM NH₄HCO₃ 450 μL、20 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O 45 μL、40 mM MOPS 45 μL、250 mM MgCl₂ 45 μL、100 mM ATP 45 μL、100 mM ADP 225 μL、50 mM NAD⁺ 450 μL、100 mM G6P 225 μL、粗酵素抽出液 (17.0 mg/mL) 180 μL、MilliQ 水またはフェノール水溶液 2790 μL を混合し、総反応液量を 4500 μL とした。

反応開始前に水浴またはヒートブロックを用いて、ATP、ADP、NAD⁺、G6P、粗酵素抽出液以外のバッファー組成の溶液を 5 分間、37°C でインキュベートし、基質成分の ATP、ADP、NAD⁺、G6P を迅速に加えてから、反応直前に粗酵素抽出液を反応液容量の 1/25 加えて開始し、総反応時間は 60 分として 37°C で反応を行った。0 分目のサンプルは、粗酵素抽出液の代わりに同じ容量になるように Wash Buffer を加えたものを用い、別途総反応液量が 1 mL となる反応液からそれぞれの条件分を 1 回ずつサンプリングした。時系列サンプリングの詳細については、第2章の 2.2.8.3 「時系列サンプリング方法」に記載した通りである。ただし、サンプリング時間についてのみ、第3章では合計 19 点のサンプリングを、0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、35、40、60 分に変更して実施した。

in vitro 酵素反応における NADH の時系列濃度変化の観察による予備検討では、紫外可視近赤外分光光度計 V-750 (JASCO ENGINEERING) を用いて、時間変化測定プログラムによって経時的に 340 nm の吸光度を測定することで NADH 濃度の生産を時系列で計測した。NADH の 340 nm におけるモル分子吸光計数は 6.22 (L/mmol/cm) とした。

また、時系列の中間代謝物質濃度の定量分析には液体クロマトグラフィー・質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた (液体クロマトグラフィー; HPLC (Agilent 1100series; Agilent Technologies)、質量分析部; MS/MS (API 2000TM LC-MS/MS システム; AB SCIEX)。中間代謝物質のピークは市販の標準物質のクロマトグラフと保持時間を比較して同定し、ピーク面積の算出には Analyst Software Version 1.6.1 (AB SCIEX) を用いた。分析パラメータの詳細については第2章の 2.2.8.4 「代謝物質濃度の測定」に記載した通りである。

3.2.9 代謝変動の観察のための律速反応の同定手法の適用

3.2.8 で行った *in vitro* 代謝経路解析で、取得した時系列の中間代謝物質濃度データから、フェノール濃度 0% (フェノールなし) とフェノール濃度 0.15% (フェノールあり) の 2 条件による解糖系の各酵素の V_{max} をそれぞれ同時推定した。この結果から、フェノール添加の有無それぞれの条件での解糖系における律速反応を同定し、フェノールを添加しない条件からのフェノール添加時における代謝の変動を調べた。

第 3 章の代謝変動の観察のための複数酵素の V_{\max} の同時推定法における時系列代謝物質データの取り扱いについては、第 2 章の 2.2.8.4 「代謝物質濃度の測定」に記載した通りに実施した。ただし、代謝物質の濃度データの相対値として用いる際の基準とするデータのサンプリングポイントは第 2 章の 2.2.8.4 では 30 分目としたが、第 3 章では G6P を除くすべての中間代謝物質の濃度データの相対値算出のための基準とするサンプリングポイントを 20 分目とした。また、*in vitro* 代謝経路解析では、サンプリングデータにおける 40 分目までの時系列データを適用して複数酵素の V_{\max} の同時推定を実行した。

また、フェノール添加の有無のどちらの条件においても、実験データの時系列における挙動にばらつきが大きかったために、第 2 章で最適化手法として用いた GA による大域的最適化手法だけでは解の収束が不十分であると考えられた。よって、複数酵素の V_{\max} 同時推定において用いる最適化手法を工夫し、GA によって最適解の近傍の解を得たのち、局所最適化の逐次二次計画法 (MATLAB の非線形最適化ソルバー *fmincon*) で最終的な最適解を得ることとした。

3.3 結果

3.3.1 大腸菌の細胞増殖に対してフェノールが及ぼす影響の評価

大腸菌野生株を初期 $OD_{600} = 0.1$ で 37°C 、70 rpm で 5 mL の M9 液体培地にて L 字型試験管にて培養を行い、フェノールによる増殖低下の影響を確認した。フェノール濃度に対する比増殖速度と到達細胞濃度 (最大到達 OD_{600}) の関係を図 3-1 に示した。比増殖速度は、フェノール未添加において 0.53 h^{-1} であったが、フェノール濃度の増加と共に徐々に低下し、フェノール濃度 0.16% における比増殖速度は 0.08 h^{-1} と、フェノール未添加に対して 85% 低下した。また、細胞濃度を表わす OD_{600} の最大値もフェノール濃度の増加と共に低下し、フェノール未添加において 2.69 であったのに対し、フェノール濃度 0.1% では 2.25、フェノール濃度 0.16% では 0.22 であった。すなわち、フェノール添加によって大腸菌野生株は、比増殖速度が遅くなり (図 3-1 (A))、かつ到達細胞濃度も低下し (図 3-1 (B))、フェノールが大腸菌の細胞増殖を抑制することが確認された。

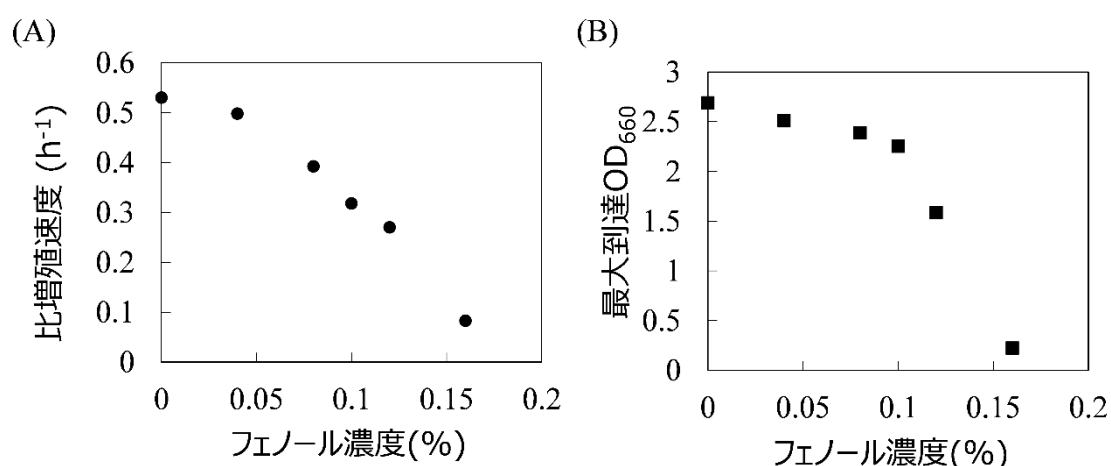


図 3-1 大腸菌野生株におけるフェノール濃度と比増殖速度(A) および最大到達 OD₆₆₀(B) との関係

(A) 横軸にフェノール濃度 (%)、縦軸に比増殖速度 (h⁻¹) を示した。(B) 縦軸に培養 24 時間目までの最大到達 OD₆₆₀ を示した。

図 3-1 より、フェノール濃度 0.16%ではほとんど増殖が見られなかったことから、このフェノール濃度が大腸菌の増殖が維持できる培地中に含まれる濃度の上限と考えた。次に、フェノール濃度による大腸菌野生株の発酵プロファイルの変化を確認するため、フェノール濃度 0%、0.1%、0.15%の 3 条件について、フラスコスケールでの回分培養を行った。

各フェノール濃度における細胞濃度を表わす OD₆₀₀、培養液中のグルコース濃度、酢酸濃度の時間変化を図 3-2 に示した。比増殖速度 (h⁻¹)、比グルコース取り込み速度 (mmol/gDCW/h)、比酢酸生産速度 (mmol/gDCW/h) を表 3-5 にまとめた。フラスコスケールにおいても、フェノール濃度の増加に伴って比増殖速度と到達細胞濃度が低下する傾向は再現された。比グルコース取り込み速度はフェノール濃度 0%の条件において最も速く、フェノール濃度が増えるにつれて低下した。一方、比酢酸生産速度はフェノール濃度が増えるにつれて増加した。また、フェノール濃度 0%と 0.1%の条件ではグルコース枯渇後に酢酸の消費が見られたが、フェノール濃度 0.15%ではグルコースが枯渇した後も酢酸は消費されなかった。いずれの条件においても、大腸菌が嫌気条件下や呼吸鎖が阻害された際に排出するエタノールや乳酸、ギ酸は培養液上清中から検出されなかった。このことから、フェノール存在条件においても、呼吸鎖に関する代謝の反応は働いていることが示唆された。

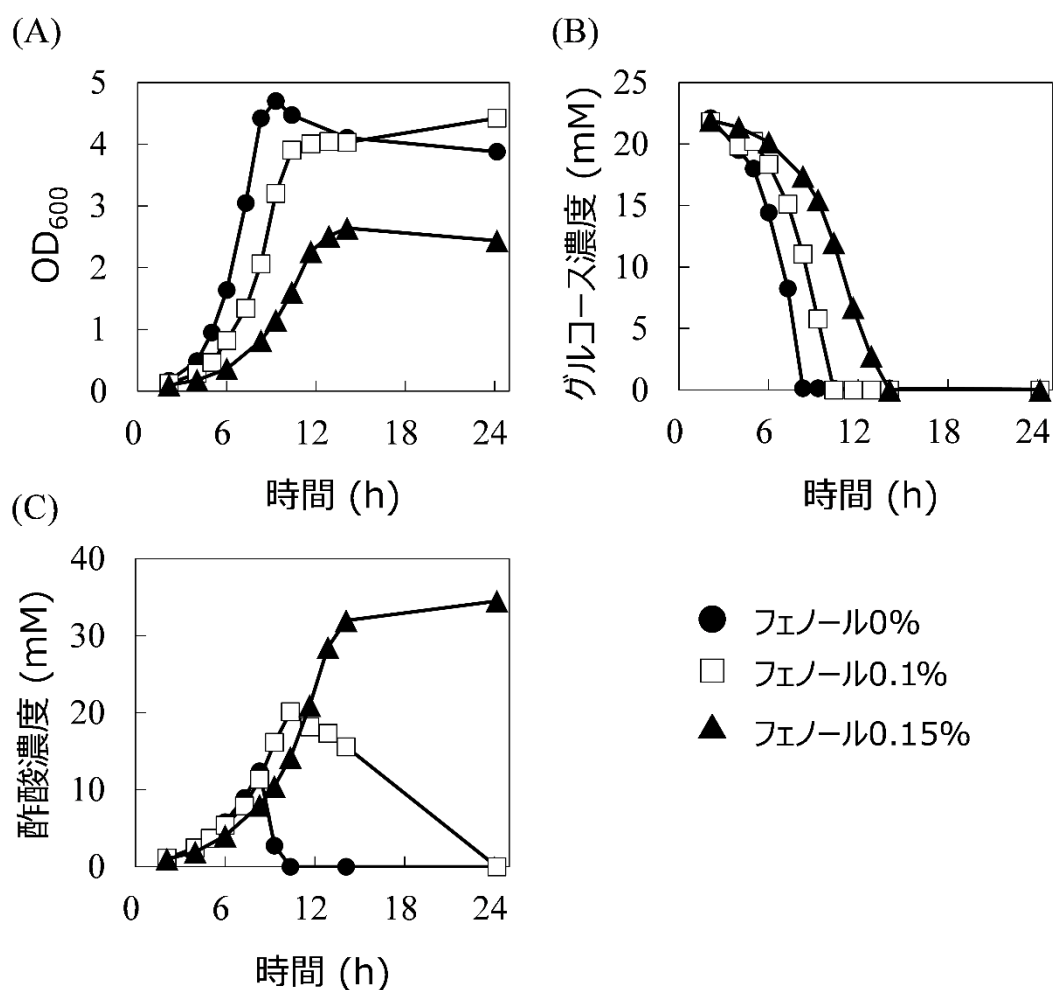


図 3-2 大腸菌野生株を異なるフェノール濃度で回分培養した結果
(A) 細胞増殖 OD₆₀₀ (B) 培養液のグルコース濃度 (C) 培養液の酢酸濃度の変化

表 3-5 大腸菌野生株の異なるフェノール濃度条件における比増殖速度、
比グルコース取り込み速度、比酢酸生産速度

フェノール濃度	比増殖速度	比グルコース 取り込み速度	比酢酸生産速度
%	h ⁻¹	mmol/gDCW/h	mmol/gDCW/h
0.00	0.59 ± 0.002	9.43 ± 0.58	6.05 ± 0.16
0.10	0.46 ± 0.001	7.68 ± 0.17	7.31 ± 0.19
0.15	0.34 ± 0.001	7.10 ± 0.22	9.53 ± 0.23

大腸菌野生株は、フェノールを添加すると酢酸生産が増大することが明らかになった (図 3-2)。この酢酸生産が大腸菌の生育に関与しているかを確認するため、酢酸生産に必要な *pta* 遺伝子を欠損した大腸菌 Δ *pta* 株を構築し、フェノール存在下で培養した。

pta 遺伝子は解糖系の最終産物の AcCoA から酢酸前駆体のアセチルリン酸への反応を触媒するリン酸アセチル転移酵素をコードする遺伝子である。大腸菌 Δ *pta* 株は、大腸菌野生株にファージ感染にて *pta* 遺伝子をテトラサイクリン遺伝子に置換することで取得した。大腸菌野生株と Δ *pta* 株の培養プロファイルを図 3-3 に示した。 Δ *pta* 株に関して、フェノール無添加では最大到達 OD₆₀₀ は野生株と同程度であったのに対し、フェノール濃度 0.15% では増殖がほとんど観察されなかった。このことから、フェノール濃度 0.15% の存在下において大腸菌が増殖するには酢酸の生産が必要とされることが示唆された。

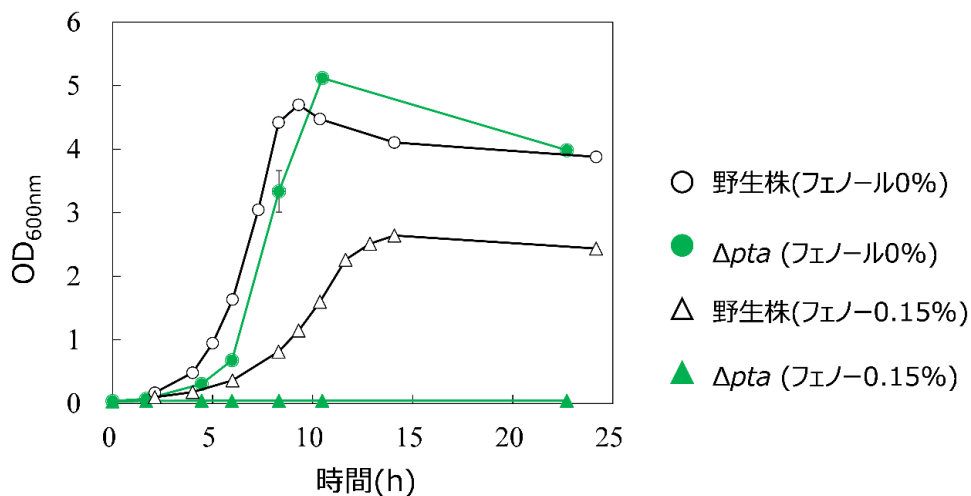


図 3-3 フェノール添加における大腸菌野生株と Δ *pta* 株の菌体増殖の様子

横軸に培養時間 (h) を、縦軸に細胞増殖 OD₆₀₀ の値を示した。白の○が野生株のフェノール添加濃度 0%、白の△が野生株のフェノール添加濃度 0.15% の条件での増殖の様子を示した。また緑の●が Δ *pta* 株のフェノール添加濃度 0%、緑の▲が Δ *pta* 株のフェノール添加濃度 0.15% の増殖の様子を示した。

3.3.2 代謝フラックス分布の推定結果

フェノールの添加によって、大腸菌の中心炭素代謝経路のうちでどの反応が影響を受け、律速となったのかを調べるために、[1-¹³C]グルコースを単一炭素源として細胞を培養し、¹³C 代謝フラックス解析を行った。対数増殖期にタンパク質由来のアミノ酸を回収し、その質量同位体分布を GC/MS で測定した。付録の Supplementary Table S6 に天然同位体の影響を除いた質量分布ベクトル (mass distribution vector: MDV) の結果を示した。表 3-5 の比速度を用い、式 3-1 に従ってフラックス分布から計算されるアミノ酸の質量同位体分布が実測値の残差二乗和 (RSS) が小さくなるように、フラックス分布を最適化した。本モデルの代謝経路の自由度は 18、最適化に使用したアミノ酸の質量同位体分布の自由度は 104 であるため、 χ^2 検定のための閾値は 108.6 である。フェノール濃度 0%、0.1%、0.15% の条件におけるフラックス推定の結果、RSS はそれぞれ 92.1、

107.1、108.0 であり、全て閾値をクリアした。すなわち、フラックス分布から計算されるアミノ酸の質量同位体分布は、実測値を全て満足させる結果であった。また、アミノ酸の質量同位体分布の実測値を全て満足させるための各フラックスの 95%信頼区間も計算した。

図 3-4 から図 3-6 に、フェノール濃度 0%、0.1%、0.15%における代謝フラックス分布を示した。また、各条件における詳細なフラックスの値を付録の Supplementary Table S7-1 から S7-3 に示した。フェノール濃度の増加に伴って比グルコース取り込み速度が低下したため、各フェノール濃度における比グルコース取り込み速度を 100%として規格化して、フェノール濃度の条件間でフラックスを比較した。相対フラックスの減少したのは主に TCA 回路の反応であり、これらすべての反応においてフラックスの低下が見られた。

TCA 回路の入口の AcCoA と OAA から IsoCit を合成するクエン酸シンターゼの反応では、フェノール濃度 0%では正味のフラックスが 3.6 mmol/gDCW/h であったのに対し、フェノール濃度 0.1%と 0.15%では正味のフラックスがそれぞれ 0.98 と 0.37 mmol/gDCW/h に低下した。このフラックスの低下は、信頼区間の幅を考慮しても条件間で明確に差異があった。同様に、TCA 回路の IsoCit から MAL の間の反応についても、フェノール濃度 0%と 0.15%との間でフラックスの信頼区間の重複は見られず、フラックスの低下が確認できた。ただし、MAL から OAA への反応においては、フラックスの信頼区間の幅が広く、本解析の結果からフラックスの低下を判断することはできなかった。IsoCit から SUC と MAL への反応であるグリオキシル酸経路はフェノール濃度 0%、0.1%、0.15%の 3 条件すべてでほとんど働いておらず、条件間における変化は見られなかった。

また、フェノール濃度 0%と 0.15%を比較すると、解糖系下流の PEP から PYR への PYK の反応においてフェノール添加によるフラックスの減少が見られた。それに伴って PEP から OAA、MAL を介して PYR を生成する迂回経路のフラックスの増加が見られた。しかし、これらの反応のフラックスについては信頼区間が広く、フラックスの変化は信頼区間の範囲内であったため、本解析の結果からフェノールの PYK への影響を議論することはできなかった。フェノール濃度の増加によって相対フラックスが有意に増大した反応は、AcCoA からの酢酸への反応のフラックスのみであった。

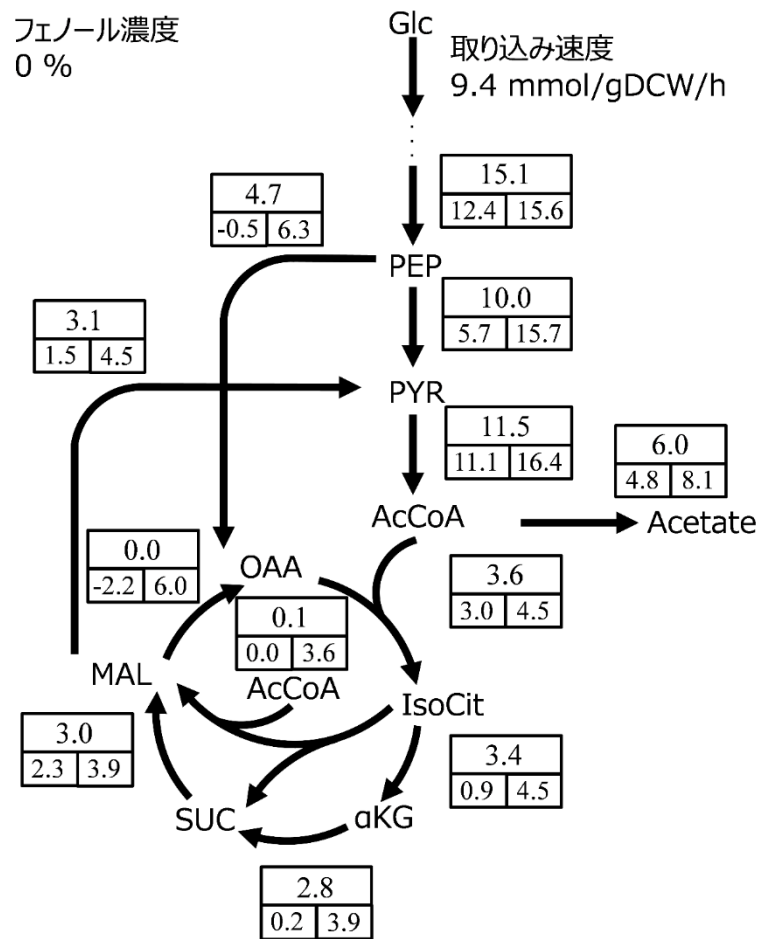


図 3-4 フェノール濃度 0%における大腸菌野生株の
中心炭素代謝経路下流のフラックス分布

図中の箱の中の数字は、上段の箱が最適解でのフラックス値、下段左が 95%信頼区間の下限のフラックス値、下段右が 95%信頼区間の上限のフラックス値を示した。

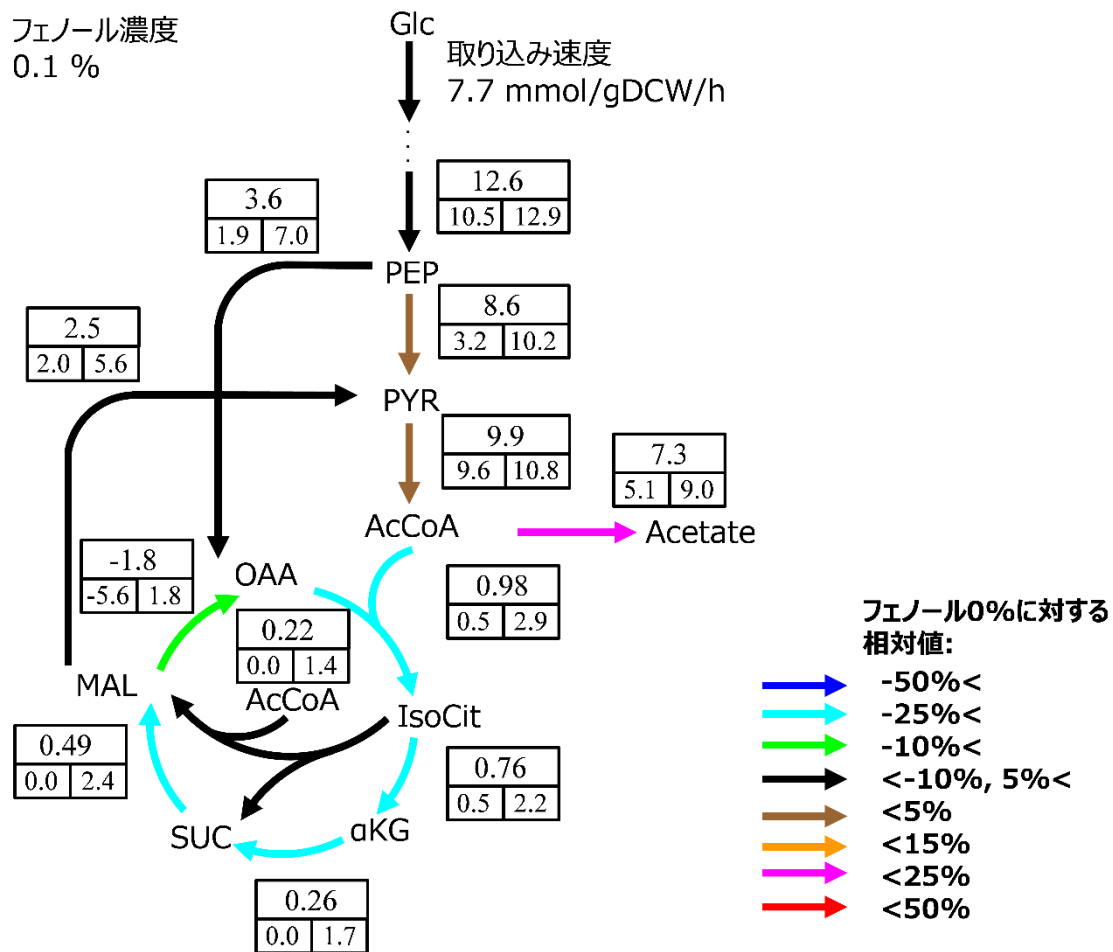


図 3-5 フェノール濃度 0.1%における大腸菌野生株の

中心炭素代謝経路下流のフラックス分布とフェノール濃度 0%との比較

図中の箱の中の数字は、上段の箱が最適解でのフラックス値、下段左が 95%信頼区間の下限のフラックス値、下段右が 95%信頼区間の上限のフラックス値を示した。

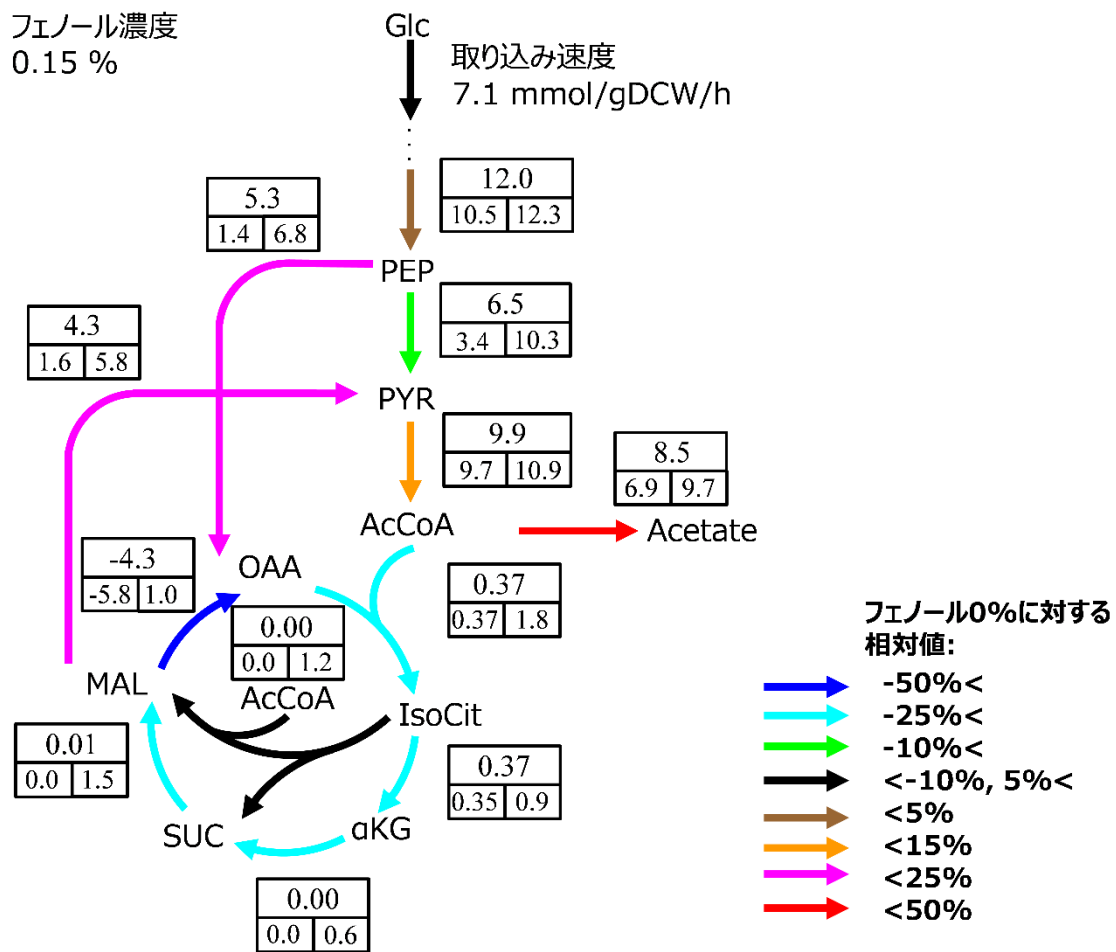


図 3-6 フェノール濃度 0.15%における大腸菌野生株の中心炭素代謝経路下流のフラックス分布とフェノール濃度 0%との比較

図中の箱の中の数字は、上段の箱が最適解でのフラックス値、下段左が 95%信頼区間の下限のフラックス値、下段右が 95%信頼区間の上限のフラックス値を示した。

3.3.3 フェノールが酵素の活性に及ぼす影響と律速反応

¹³C 代謝フラックス解析の結果から、フェノール濃度 0%の条件に比較してフェノール濃度 0.15%の条件では TCA 回路のフラックスが減少したことが明らかになった (図 3-4、図 3-6)。グルコースから解糖系を経由して合成された AcCoA は、酢酸もしくは IsoCit に分岐して代謝される。すなわち、図 3-5、図 3-6 において推定したフラックス分布は、この AcCoA から酢酸または IsoCit への分岐箇所においてフラックスが低下している AcCoA から IsoCit への反応が、中心炭素代謝経路の律速反応になっていることを示唆している。また、TCA 回路の中間代謝物質である Cit や α KG、OAA などの排出も見られていない。よって、このことから、TCA 回路の一番目の反応であるクエン酸シンターゼが触媒する AcCoA から IsoCit への反応がフェノールによって活性低下の影響を受けた反応であると考えられた。すなわち、クエン酸シンターゼの反応が、フェノー

ル添加条件において律速反応となると予想された。

そこで、クエン酸シンターゼに着目し、*in vitro* 酵素反応測定によって、 V_{max} を調べることにした。まず、フェノール存在下におけるクエン酸シンターゼの酵素発現量の低下が、クエン酸シンターゼの V_{max} の低下を引き起こし、フェノール添加条件においてクエン酸シンターゼが律速反応となったと推測した。この推測の検証のために、各フェノール濃度で培養した大腸菌の菌体から粗酵素抽出液を調製し、反応液にはフェノールを添加することなく、クエン酸シンターゼの *in vitro* 酵素反応測定実験を行った。

図 3-7 の左列にポジティブコントロールとして、フェノール添加なしに培養したクエン酸シンターゼの過剰発現株 *gltA*+株の菌体から得た粗酵素抽出液のクエン酸シンターゼ活性を、中央と右列に野生株をフェノール濃度 0%、0.15% の各フェノール濃度下で培養した菌体から得た粗酵素抽出液のクエン酸シンターゼ活性を示した。

図 3-7 のクエン酸シンターゼの過剰発現株由来のサンプルでは、高い V_{max} が検出されており、この *in vitro* 酵素反応測定系の妥当性が確認された。また、フェノール濃度 0% と 0.15% の培養実験から取得した野生株由来のサンプルでは、 V_{max} には差が見られなかった。この結果は、大腸菌の培養時の培養液中のフェノールの存在は、大腸菌の細胞内のクエン酸シンターゼの酵素発現量に影響を与えず、クエン酸シンターゼの活性の低下を引き起こしたわけではないことを示唆している。

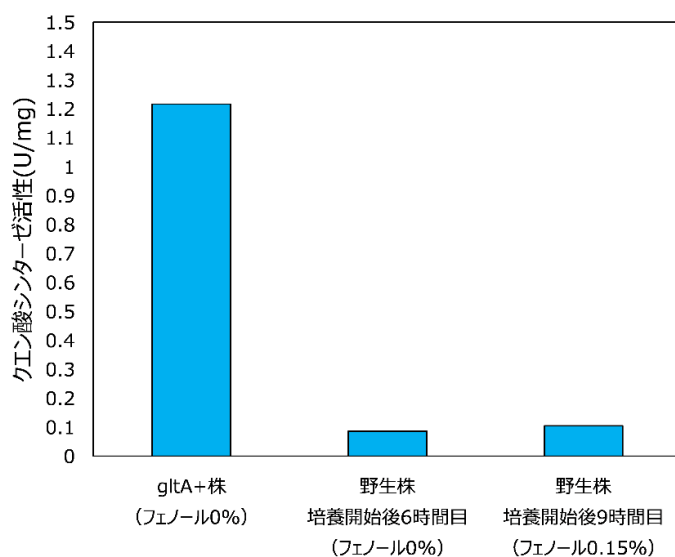


図 3-7 フェノール濃度 0% (中央) と 0.15% (右) を添加して培養した際の
大腸菌野生株のクエン酸シンターゼの活性の比較

左列は、フェノール濃度 0% で培養したクエン酸シンターゼの過剰発現株由来の粗酵素抽出液の活性を示した。中央と右列では、大腸菌野生株を各フェノール濃度で培養し、培養開始後 6 時間目と 9 時間目で回収した菌体ペレットから得た粗酵素抽出液の酵素活性を示した。*in vitro* 酵素反応測定時にはフェノールを添加することなくクエン酸シンターゼの活性測定を行った。

次に、フェノール存在下においてクエン酸シンターゼの V_{\max} が低下し、クエン酸シンターゼがフェノール存在下において律速反応となった要因として、フェノールが酵素反応に直接作用して V_{\max} を低下させたという可能性を調査した。大腸菌クエン酸シンターゼの過剰発現株 *gltA+*株から取得した粗酵素抽出液を用いて、*in vitro* 酵素反応測定時に反応液にフェノールを加え、クエン酸シンターゼの酵素活性を評価した (図 3-8 (A))。また、フェノールがタンパク質を変性させていないことを確認するため、 ^{13}C 代謝フラックス解析の結果でフェノール添加によるフラックスに変化がみられなかった、解糖系の PGI について、ポジティブコントロールとしてフェノール添加が V_{\max} に及ぼす影響を評価した (図 3-8 (B))。大腸菌のクエン酸シンターゼの V_{\max} は、フェノール添加を行わなかった場合と比較して、反応液中に 0.1%、0.15%、0.3%のフェノール濃度を添加するとそれぞれ 59.8%、56.6%、24.6%に低下した (図 3-8 (A))。一方で、PGI の V_{\max} はフェノール濃度の影響を受けておらず、このフェノール濃度ではタンパク質は変性しないことも確認できた。これらの結果から、フェノールの添加は、クエン酸シンターゼの酵素の発現量の低下やタンパク質への変性に作用するのではなく、酵素反応に作用することで、クエン酸シンターゼの V_{\max} を低下させており、クエン酸シンターゼがフェノール添加時に中心炭素代謝経路における律速反応となることが明らかになった。

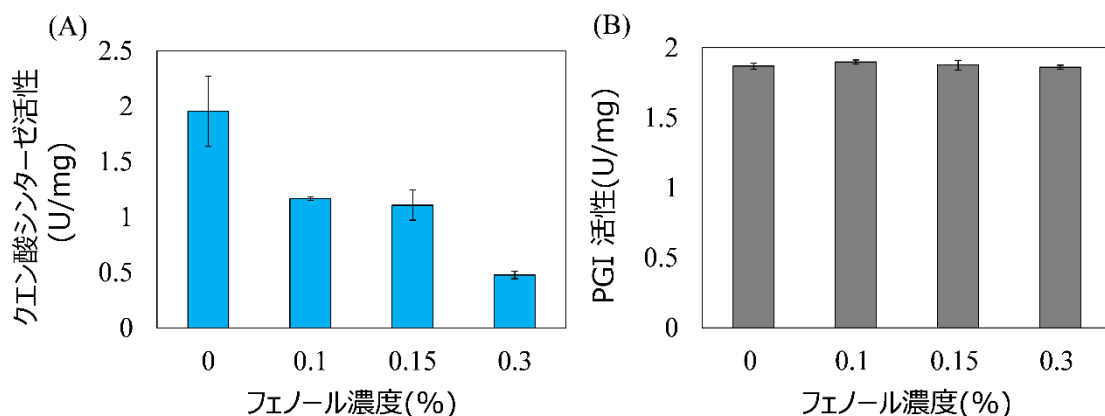


図 3-8 フェノール濃度と大腸菌 *gltA+*株のクエン酸シンターゼ活性との関係 (A) とフェノール濃度と大腸菌野生株の PGI 活性との関係 (B)

(A) クエン酸シンターゼ過剰発現株 *gltA+*株由来の粗酵素抽出液を用いて測定した。
 (B) 野生株由来の粗酵素抽出液を用いて測定した。それぞれ用いた菌体の培養時にはフェノールは添加しておらず、*in vitro* 酵素反応測定時に各濃度のフェノールを添加した。測定は 3 重測定で実施した。

図 3-8 (A) でのフェノール濃度とクエン酸シンターゼ活性との関係より、クエン酸シンターゼの活性は、 ^{13}C 代謝フラックス解析のフェノール濃度の上限条件であるフェノール濃度 0.15%の条件では、フェノール濃度 0%に対して 43%低下していた。このこと

は、フェノール濃度 0.15%における ^{13}C 代謝フラックス解析で、TCA 回路の AcCoA と OAA から IsoCit へのフラックスが 0.4 mmol/gDCW/h となり、フェノール濃度 0%における 3.6 mmol/gDCW/h から、相対値で 33%低下していたことを支持する結果となった。

フェノール添加によってクエン酸シンターゼへ活性低下の影響がもたらされることが明らかとなったため、この活性低下分を補うべく、クエン酸シンターゼをコードする *gltA* 遺伝子を過剰発現させることで、抑制されていた増殖が回復する可能性が考えられた。そこで、図 3-9 に結果を示した実験では、フェノールを添加した条件における大腸菌の増殖の回復の可能性について検証した。フェノールへの耐性についてのクエン酸シンターゼ過剰発現の影響を評価するために、クエン酸シンターゼ過剰発現株 *gltA+*株をフェノールの濃度が異なる M9 最小合成培地に添加して培養を行った。このクエン酸シンターゼ過剰発現株 *gltA+*株では IPTG によって制御を受ける *T5-lac* プロモーターによって発現が誘導されているため、培養時に終濃度 50 μM の IPTG を添加した。

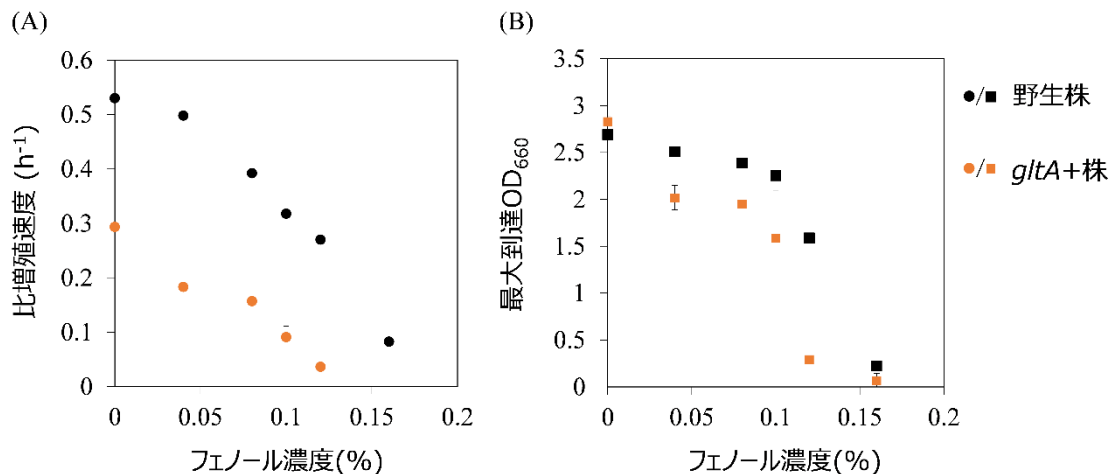


図 3-9 大腸菌野生株と *gltA+*株におけるフェノール濃度と比増殖速度(A) および最大到達 OD₆₆₀(B)の関係

(A) 横軸にフェノール濃度 (%)を、縦軸に比増殖速度 (h⁻¹) を示した。(B) 縦軸に培養 24 時間目までの最大到達 OD₆₆₀を示した。黒色の●または■で野生株を、オレンジ色の●または■で *gltA+*株を示した。

図 3-9 に示した通り、培地中のフェノール濃度の上昇に伴い、*gltA+*株においても比増殖速度と最大到達 OD₆₆₀ に低下が見られ、野生株よりも *gltA+*株の方がフェノール添加による増殖低下の影響が大きかった。フェノール添加なしの条件と比べて、0.12%のフェノール存在下では、野生株の比増殖速度の低下率が 41.0%であったのに対して、*gltA+*株は 87.6%であった。さらに、*gltA+*株はフェノール濃度 0.15%ではほとんど増殖が見られなかった。

この結果から、フェノール添加による TCA 回路のクエン酸シンターゼの V_{\max} 低下を

補うために、単にクエン酸シンターゼの酵素発現量を増大させるだけでは大腸菌の増殖は回復しないことが明らかになった。また、一方で、クエン酸シンターゼ過剰発現 *gltA+* 株は、フェノールが培地中に存在しない条件においてでさえも、細胞増殖に与える負荷が深刻であるため、クエン酸シンターゼの発現レベルの微調節が必要と考えられた。

大腸菌は SUC、FUM、MAL、OAA を炭素源として取り込み、増殖可能であることが報告されている (Gutowski and Rosenberg, 1975; Paliy and Gunasekera, 2007)。このことから、大腸菌がフェノールの添加によるクエン酸シンターゼの V_{\max} 低下の影響を相補する別の手段として、SUC や FUM などの、TCA 回路のクエン酸シンターゼ以降の中間代謝物質を細胞の外部から追加の基質として供給することで、大腸菌の TCA 回路のフラックス低下を補うことが有効であるかもしれない。

3.3.4 大腸菌野生株のフェノールの添加有無による *in vitro* 代謝経路解析

^{13}C 代謝フラックス解析の結果からは、0.15%の濃度でフェノールを添加すると、解糖系の最終産物である AcCoA から酢酸合成と TCA 回路に分岐におけるフラックス比が変化することが明らかとなり、TCA 回路の最初の反応であるクエン酸シンターゼの反応が、大腸菌の中心炭素代謝経路におけるフェノール添加時の律速反応として同定された (図 3-6)。一方で、PEP から OAA への補充経路は存在するものの、TCA 回路以前の分岐までの解糖系については直線経路であるため、 ^{13}C 代謝フラックス解析の結果からは、どの反応の V_{\max} がフェノール添加によって影響を受け、どの反応が律速反応となっているのかを議論することはできない。そこで、第 2 章で開発した *in vitro* 代謝経路解析を用いて、上流の解糖系の 10 個の酵素反応について、フェノール添加によって V_{\max} の値に変化が生じているのかを調べ、TCA 回路の分岐までの解糖系における律速反応を調査した。

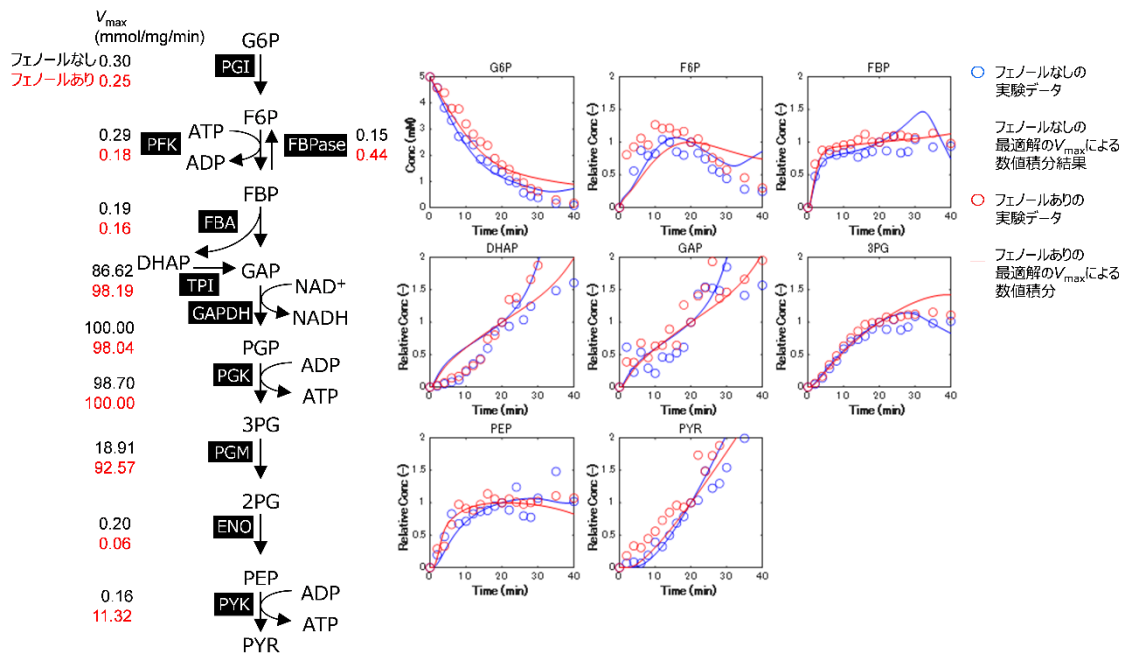


図 3-10 フェノール濃度 0%と 0.15%における解糖系中間代謝物質の時系列濃度変化

左の図は解糖系の経路を示し、酵素名横の数値は最適解の V_{max} (mmol/mg/min) の推定値である。黒字の数値はフェノール濃度 0%、赤字の数値はフェノール濃度 0.15%における V_{max} を示した。右のグラフは、横軸が時間、縦軸が代謝物質の濃度 (または相対濃度) である。○のシンボルは *in vitro* 実験によって得られた代謝物質の濃度を示し、実線は最適解の V_{max} における反応速度論モデルの数値積分結果を示したものである。青色はフェノール濃度 0%、赤色はフェノール濃度 0.15%のものを示した。G6P は濃度の絶対値を示しており、それ以外の代謝物質は 20 分目の中間代謝物質の濃度を「1」としたときの相対値を示した。3PG は「3PG+2PG」として表わした。

in vitro 代謝経路解析の結果を図 3-10 に示した。フェノール濃度 0%(フェノールなし)の場合 (青色の○と青色の実線) と、フェノール濃度 0.15% (フェノールあり) の場合 (赤色の○と赤色の実線) では、どちらの条件においても実験データの時系列における挙動にばらつきが大きかったために、GA による大域的最適化手法だけでは解の収束が不十分だと考えられた。そこで、 V_{max} 同時推定のための最適化手法を工夫し、GA によって最適解の近傍の解を得たのち、局所最適化の逐次二次計画法で最適解を得ることとした。

結果として、 V_{max} 同時推定で得られた最適解の RSS は、フェノールなしで 11.77、フェノールありで 7.77 であった。また、一方で、図 3-10 の右側に示したように、フェノールありなしにおける各中間代謝物質の時系列濃度変化のグラフを重ね合わせることで、フェノールありなしの 2 条件の間において、解糖系の中間代謝物質の時系列の濃度変化には大きな差は認められないことが分かった。

3.3.5 *in vitro* 代謝経路解析からの律速反応同定によるフェノール添加時の代謝変動の観察

図 3-10 に示した時系列の中間代謝物質の濃度変化より、フェノールありなしの 2 条件において、それぞれ第 2 章で構築した複数酵素の V_{max} の同時推定方法を適用することで、中心炭素代謝経路のうち、 ^{13}C 代謝フラックス解析では詳細な代謝の変動を捉えることができなかった、上流部分の解糖系について V_{max} を同時推定することで代謝の変動について観察し、解糖系における律速反応を同定することを試みた (図 3-11)。 V_{max} の推定は、GA と局所最適化の逐次二次計画法を組み合わせた手法によって行った。設定した閾値 (フェノールなしで 13.3、フェノールありで 10.9) を下回った 13 回の最適化の試行結果から V_{max} の推定範囲を求めた。各反応の V_{max} の推定範囲は 0.01 - 100 mmol/mg/min に設定した。

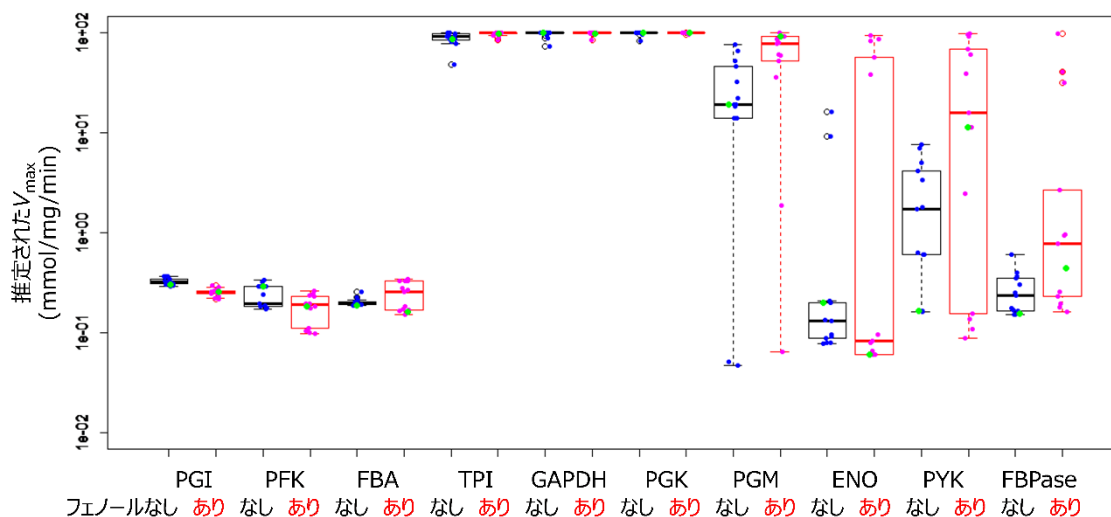


図 3-11 フェノールの有無における解糖系の各酵素の V_{max} の推定値の比較

横軸に解糖系の G6P から PYR までの反応における酵素を順番に示し、PFK の逆反応の FBPase は最後に示し、それぞれの酵素ごとにフェノールなし (青の点と黒の箱ひげ)、あり (マゼンタの点と赤の箱ひげ) を左右に並べて示した。縦軸には推定された V_{max} (mmol/mg/min) を対数で示した。中央太線：中央値。箱の最上端：第 3 四分位数。箱の最下端：第 1 四分位数。○：外れ値。上側のひげ、下側のひげ：(第 1 四分位数 - 1.5x (第 3 四分位数 - 第 1 四分位数)) 以上 (第 3 四分位数 + 1.5x (第 3 四分位数 - 第 1 四分位数)) 以下の範囲で、それぞれ最も大きいデータ点および最も小さいデータ点。緑色の点で最適解の V_{max} を示した。

図 3-10 のフェノールありなしの 2 条件の比較によって、解糖系の時系列の中間代謝物質の濃度変化において、フェノールありなしの間に大きな差異は認められないという結果は、図 3-11 の V_{max} の推定結果からも示すことができた。すなわち、推定範囲の狭

い PGI、PFK、FBA、TPI、GAPDH、PGK の V_{\max} の傾向は 2 条件で一致した。また、PGM、ENO では、箱ひげ図のひげや外れ値を踏まえるとどちらの条件も V_{\max} の推定範囲が広く、同様の傾向を示した。PYK、FBPase の V_{\max} は、中央値、最適解ともに、フェノールなしよりもありで大きな値となったが、フェノールありにおける V_{\max} の推定範囲が広いため、フェノールの添加による影響はほとんどないと考えられた。よって、フェノールの添加を行った場合でも、解糖系における律速反応はフェノールなしの条件から変化がないと判断された。

フェノールありの条件における PFK と FBA の V_{\max} は、推定範囲がフェノールフェノールなしの条件よりもわずかに広くなり、推定範囲の下限を比較すると PFK の方が FBA よりも V_{\max} の推定値は小さくなった。しかし、最適解の V_{\max} の推定値は、PFK が 0.18 mmol/mg/min で、FBA が 0.16 mmol/mg/min となり、FBA の方が小さく、PFK も FBA も、同等程度に解糖系内で最小となり、律速反応であると結論づけられた。よって、フェノールなしと同様に、フェノールありにおいても、FBA は解糖系の律速反応であると同定された。

PGI に関して、 ^{13}C 代謝フラックス解析の結果と、図 3-8 (B) に示した従来法の *in vitro* 酵素反応測定による PGI の活性の測定結果から、解糖系上流の PGI の活性はフェノールの添加による影響を受けないことが示された。図 3-11 に示した、複数酵素の V_{\max} の同時推定法で得られた結果においても、PGI はフェノールの有無によらず推定された V_{\max} の値にほとんど差はなく、従来法の *in vitro* 酵素反応測定法と第 2 章の複数酵素の V_{\max} の同時推定法との手法間における再現性と検証結果を示すことができた。また、 ^{13}C 代謝フラックス解析の結果との一貫性も示された。

フェノール濃度 0%、0.15% の 2 条件において、解糖系における *in vitro* 代謝経路解析を行うことで、 ^{13}C 代謝フラックス解析ではフェノール濃度 0% と 0.15% の条件間で詳細な代謝の変動を捉えることができなかつた、中心炭素代謝経路の上流部分の解糖系について複数酵素の V_{\max} の同時推定を行った。さらに、その 2 条件における V_{\max} の同時推定の結果によって、それぞれの条件における解糖系の律速反応を同定し、フェノール濃度 0.15% における律速反応がフェノール添加なしの条件から変化するかを調査した。

結果として、*in vitro* 代謝経路解析に用いた実験データのばらつきはあるものの、解糖系において推定された各酵素の V_{\max} は、フェノール濃度 0.15% において、PGI、PFK、FBA、TPI、GAPDH、PGK、PGK においてはフェノール濃度 0% と同様の傾向を示し、ENO、FBPase においても V_{\max} の推定値に大きな差は認められないという結果となった。また、解糖系の最後の反応である PYK の V_{\max} に関しては、従来法の *in vitro* 酵素反応測定法の結果 (Supplementary Figure S4) も踏まえて、フェノール濃度 0% と 0.15% との間で大きな差は認められなかつた。よって、フェノール濃度 0% と 0.15% の 2 条件間では、解糖系の各酵素の V_{\max} に顕著な差は認められず、フェノールの添加条件によらず、FBA が解糖系における律速反応であった。すなわち、解糖系において、フェノールの添加の影響による律速反応への変化は見られず、代謝への変動は認められなかつた。

フェノール濃度 0.15%における大腸菌の増殖低下を引き起こす原因となる中心炭素代謝経路の律速反応は、 ^{13}C 代謝フラックス解析と検証実験の従来法の *in vitro* 酵素反応測定の結果によって得られた TCA 回路のクエン酸シンターゼであるということが分かった。また、大腸菌の解糖系は、フェノールの添加によって律速反応は変化せず、代謝状態への影響をほとんど受けないということも分かった。

3.4 考察

大腸菌において、フェノールの影響によって増殖が低下することは知られていた (Kim *et al.*, 2014) が、これまでにフェノールが大腸菌の代謝に及ぼす影響は詳細には調べられたことはなかった。今回、大腸菌のフェノールによる増殖低下、増殖抑制の原因を代謝についての観点から詳細に調査を行った。

まず、フェノールによって増殖は行われるものの、増殖低下がみられるフェノールの培地中への添加濃度を検討し、代謝解析のための培養に適したフェノール濃度を、0.1%、0.15%に決定した (図 3-1)。検討した結果、フェノール濃度 0.16%では増殖が 85%抑制されてしまったため、増殖の抑制がかかりすぎるため、フェノール濃度の上限を 0.15%とした。

次に、フェノール濃度 0%、0.1%、0.15%で $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースを炭素源に培養を行った。培養中の OD_{600} 、培養液中のグルコース濃度、培養液中の酢酸濃度の時系列データを取得したところ、酢酸濃度の時系列データにおいてフェノール濃度 0.15%で顕著に変化が見られた。フェノール濃度 0.1%では 10.4 時間目が酢酸濃度は最大となり、その後、酢酸は消費されたと考えられたが、フェノール濃度 0.15%では、フェノール濃度 0.1%で行われていた酢酸消費の代謝経路が働かず、好気呼吸の代謝経路のみである一方で、増殖継続のために大腸菌は酢酸を排出していると考えられた。

フェノール濃度 0%、0.1%、0.15%の培養実験データに基づく ^{13}C 代謝フラックス解析により、フェノール濃度 0.1%、0.15%で AcCoA から細胞外の酢酸への排出が著しく増大していることが示され、酢酸の排出を行うために PYR から AcCoA を経て酢酸へ流れる経路のフラックスが増大し、OAA、AcCoA からの TCA 回路のフラックスがほぼなくなっていることが示された。また、IsoCit から SUC、MAL への反応である、グリオキシル酸経路はフェノール濃度 0%、0.1%、0.15%の 3 条件すべてでほとんど働いていないことに関して条件間における変化は見られず、フェノール添加濃度 0.1%、0.15%で TCA 回路内の代謝物質である SUC や MAL への代謝反応がほとんどない (フラックスがほとんど 0 であった) ことから、TCA 回路の最初の反応を触媒する酵素であるクエン酸シンターゼの酵素反応が低下し、TCA 回路が働かなくなっていることが推察された。よって、フェノール添加条件において、クエン酸シンターゼの反応が大腸菌の中心炭素代謝経路における律速反応であると推定された。

フェノールを添加せずにクエン酸シンターゼの *in vitro* 酵素反応測定をおこなった結

果、フェノール濃度 0%、0.15%で培養を行った大腸菌野生株ではクエン酸シタターゼ活性の値に、培地中に添加したフェノール濃度条件間での変化は見られなかった (図3-7)。このことから、培地中へフェノール添加濃度を変化させて大腸菌を培養したとしても、フェノール濃度 0 - 0.15%の間では、野生株の細胞内におけるクエン酸シタターゼの発現量には変化が見られないことが示された。

大腸菌においてクエン酸シタターゼが過剰に発現している状況下におけるフェノールの影響について確認するために、大腸菌クエン酸シタターゼ過剰発現株 *gltA+*株を用いて、フェノールを添加せずに培養を行い、粗酵素抽出液を得た。この大腸菌クエン酸シタターゼ過剰発現株 *gltA+*株の粗酵素抽出液を用いて、フェノール濃度 0%、0.1%、0.15%、0.3%の条件において、クエン酸シタターゼの *in vitro* 酵素反応測定時に各濃度のフェノールを直接添加することで、クエン酸シタターゼ活性を測定した。この測定結果によって、フェノール濃度 0.15%でフェノール濃度 0%に対してクエン酸シタターゼ活性が 56.6%に低下し、大腸菌においてはフェノール濃度依存的にクエン酸シタターゼ活性が低下することが分かった (図 3-8 (A))。このことから、フェノールを添加した培地中で大腸菌が増殖低下する原因は、フェノールによってクエン酸シタターゼの活性が低下することによって TCA 回路の反応がなくなり、かつ、PYR から AcCoA を経由して酢酸への排出が、大腸菌が消費できないほど過剰に増大することであることが示唆された。よって、この *in vitro* 酵素反応測定による検証を経ることで、¹³C 代謝フラックス解析の結果から、フェノール添加条件において中心炭素代謝経路の律速反応であると推定されたクエン酸シタターゼを、律速反応であると同定することができた。

¹³C 代謝フラックス解析からは代謝経路においてフラックスがどのように変化したかは明らかにできるが、フラックスの変化を引き起こすメカニズムは明らかにできない。加えて、¹³C 代謝フラックス解析では定常状態を仮定するため、一連の連続する経路のフラックスは推定できるが、経路内でのどの反応が原因となってフラックスの変化を引き起こすのかを同定するのは難しい。フラックスの変化の作用機序についての議論は、酵素の発現や反応阻害などのような細胞のシステムを理解した上でなされなければならない。例えば、フラックス分布の情報だけでは酢酸生産が TCA 回路のフラックスの低下を引き起こすかどうかを結論づけることはできない。しかし、大腸菌において、酢酸合成によって代謝のオーバーフローが引き起こされることが知られている (Castaño-Cerezo *et al.*, 2009)。それゆえ、クエン酸シタターゼの従来法の *in vitro* 酵素反応測定の結果を受けて、大腸菌野生株ではフェノールを添加した培養時に、TCA 回路のフラックスがフェノールによって抑制されるため、酢酸へのフラックスのオーバーフローが増加すると考えられた。

大腸菌において TCA 回路のフラックスの減少がフェノールの存在下で生じるのはなぜだろうか。呼吸鎖と TCA 回路は NADH を介してつながっており、呼吸鎖に損傷がおきると、TCA 回路のフラックスが減少すると考えられる。もしそうであるとすると、NADH が蓄積され、嫌気発酵などでは解糖系によって NADH が再生産されるため、大

腸菌では酢酸やエタノールが生産される。しかし、今回のフェノール添加条件における発酵産物に関して、HPLCによる培養液上清中の有機酸の分析によって乳酸やエタノールは培養液上清から検出されなかった。さらに、呼吸鎖の阻害は大腸菌においてグルコースの取り込みを増大させる (Kihara *et al.*, 2012) が、表 3-5 に示した通り、培地中へのフェノール存在下の比グルコース取り込み速度に減少が見られたため、呼吸鎖が阻害されたのではないと考えられた。また、もし、 α ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼやアコニターゼがフェノールによって阻害されるなら、 α KG やクエン酸がそれぞれオーバーフローするはずである。しかし、HPLCによる培養液上清の有機酸の分析によって、 α KG や Cit のどちらも検出されなかったため、 α ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼやアコニターゼが阻害されたのではないと考えられた。これらの結果から、フェノール添加条件における大腸菌では、TCA 回路の最初の酵素反応であるクエン酸シンターゼの箇所での反応が抑制されていたと考えられた。

さらに加えて、図 3-2 における大腸菌の培養プロファイルが示す通り、培地中にフェノールが存在しない条件の大腸菌野生株ではグルコースが枯渇した後に酢酸が即座に消費された。それに対して、フェノール濃度 0.1%ではグルコース枯渇後の酢酸の消費が顕著に低下し、さらに、フェノール濃度 0.15%では酢酸の消費が完全に停止した。酢酸を炭素源として増殖する大腸菌において、酢酸は AcCoA として代謝され、グリオキシル酸経路を経由して TCA 回路へと異化され、炭素源の CO₂ 排出を回避している (Zhao and Shimizu, 2003)。それゆえ、フェノールによって直接、酵素反応に阻害を受けている反応は、酢酸の異化経路と共通の反応であると考えられる。

酢酸の取り込みとグリオキシル酸経路は、グルコースの取り込み段階において働かない経路である。AcCoA から Cit への反応が共通であるから、フェノールによって阻害される反応として、この反応を触媒する反応であるクエン酸シンターゼに焦点を当てた。

¹³C 代謝フラックスの変化は、酵素の発現量の変化や反応阻害などのようにいくつかの要因によって生じる。クエン酸シンターゼは、Cra、ArcAB、Fnr などのようなさまざまな転写因子によって遺伝子発現レベルにおいて制御される重要な酵素である (Matsuoka and Shimizu, 2011)。まず、酵素発現における変化を調べるために、培地中に異なる濃度でフェノールを添加して培養したときに得られた大腸菌野生株の細胞からの粗酵素抽出液によってクエン酸シンターゼの *in vitro* 酵素反応測定を行った (図 3-7)。しかし、それらにおいてフェノールの濃度による変化は見られなかった。

次に、大腸菌においてクエン酸シンターゼにフェノールが影響を及ぼすのかを調べるために、培地中にフェノールを添加せずに得た大腸菌クエン酸シンターゼ過剰発現株 *gltA+* 株の粗酵素抽出液を用いて、*in vitro* 酵素反応測定の反応液中にフェノールを添加し、酵素活性を評価した。図 3-8 (A) に示す通り、フェノール濃度 0.15%によってクエン酸シンターゼの酵素活性が 56.6%に低下した。フェノールは疎水性の物質であることから、細胞膜への浸透性が高い。フェノールの濃度が細胞の内外で共通であるとする仮定において、フェノール濃度の検討によって、*in vivo* でのクエン酸シンターゼの活性に

も影響を及ぼすと考えられた。これらのクエン酸シキターゼの *in vitro* 酵素反応測定の結果は、フェノールが酵素の反応レベルには影響を与えるが、細胞内における遺伝子発現のレベルでは影響を与えないことを示唆している。¹³C 代謝フラックス解析の結果によって、フェノール濃度 0.15% の条件において、TCA 回路の入口のクエン酸シキターゼのフラックスが 11% まで厳しく阻害されるため、その他の TCA 回路の構成要素の酵素の活性も低下し、TCA 回路全体のフラックスが低下したと示唆される。今後、フェノール濃度による遺伝子発現プロファイルの比較解析をすることによって、今回の阻害要因を同定することができるようになるだろう。

フェノールの存在下での酢酸のオーバーフローを減少させるために、酢酸形成経路を触媒するリン酸トランスアセチラーゼをコードする *pta* 遺伝子のノックアウト株 (Δ *pta* 株) について調べた (図 3-3)。その結果、 Δ *pta* 株は野生型よりもフェノール耐性が弱かった。 Δ *pta* 株はフェノール濃度 0.15% で増殖することができなかった。よって、 Δ *pta* 株はフェノール存在下で酢酸を解糖系の最終産物として排出することができず、過剰な中間代謝物質の蓄積が細胞内で生じ、解糖系における代謝の流れを阻害していると示唆される。他の仮説として、アセチル化によるタンパク質の翻訳後修飾によって代謝のふるまいに影響が及ぼされていることが挙げられる。酢酸合成経路における中間代謝物質であるアセチルリン酸は、様々なタンパク質のリジンのアセチル化にとってアセチル基の供与体である。これに関連して、イソクエン酸リアーゼのアセチル化がグリオキシル酸経路と酸耐性感受性へ関連する転写因子 RcsB の活性化に影響を及ぼすことが報告されている (Castaño-Cerezo *et al.*, 2014)。

本研究では、¹³C 代謝フラックス解析と *in vitro* 酵素反応測定によって TCA 回路のフラックスの減少はクエン酸シキターゼのフェノールによる活性への阻害が原因であると明らかにすることができた。言い換えると、フェノール添加条件において、クエン酸シキターゼが大腸菌の中心炭素代謝経路における律速反応であることを同定することができた。

また、¹³C 代謝フラックス解析から推定したフラックス分布に基づいて、ATP 再生量を計算する (Supplementary Figure S5) と、基質レベルのリン酸化による ATP 再生速度はフェノールの濃度が変化してもほとんど変わらなかったが、酸化的リン酸化による ATP 再生速度は培地中へのフェノール存在条件下で培地にフェノールが存在しない条件よりも約 10 - 20 mmol/gDCW/h 低下していた。このことから、培地中へのフェノール添加によって大腸菌野生株の細胞内では ATP が呼吸鎖によって十分に生産されていないことが示された。よって、TCA 回路のフラックスの低下により、ATP 再生量が小さいことが、大腸菌野生株の増殖速度の低下の一つの要因となっていると考えられた。さらに、培地中へのフェノール存在下において、グルコースから取り込んだ炭素源が代謝のオーバーフローによって酢酸として失われるため、大腸菌野生株のバイオマス収量の低下が起き、最大到達 OD₆₀₀₍₆₆₀₎ の低下が生じていた。

大腸菌の中心炭素代謝経路において、AcCoA は TCA 回路と酢酸合成の間の分岐点で

あるから、クエン酸シンターゼがフェノールによって酵素反応への阻害を受けることで、TCA 回路への炭素の流れがブロックされ、炭素が酢酸合成へと流れる酢酸のオーバーフローが強化されてしまっていた。さらに、アセチル-リン酸は酢酸合成経路の中間代謝物質であるため、タンパク質のアセチル化を受けた遺伝子発現や酵素活性の変化を受けて、アセチル-リン酸の蓄積が TCA 回路のフラックスに影響を与えているかもしれない。

また、 ^{13}C 代謝フラックス解析では代謝の流れの詳細について解明することが困難であった、中心炭素代謝経路の上流の解糖系について、第 2 章で開発した *in vitro* 代謝経路解析による複数酵素の V_{\max} 同時推定手法を適用し、フェノール存在下における律速反応を同定し、フェノールの影響による律速反応の変化を調べた。この実験の結果についても、細胞膜を通してフェノールが細胞内の酵素にまで浸透されているという仮定の下で、細胞内に置き換えて考えることができる。図 3-10 に示した通り、フェノール濃度 0%と 0.15%の条件間で、解糖系の時系列の中間代謝物質の濃度変化に大きな差は見られなかった。この時系列の中間代謝物質の濃度変化のデータを用いた複数酵素の V_{\max} 同時推定結果では、図 3-11 に示した通り、第 2 章の結論と同様に、フェノール濃度 0%、0.15%の条件間でともに最適解の V_{\max} の値において FBA が経路内で最小となり、FBA が解糖系の律速反応であることが示された。よって、この結果から大腸菌が増殖低下を引き起こすフェノール濃度 0.15%でも、大腸菌の解糖系の律速反応には変化がみられず、解糖系の代謝反応はほとんど影響を受けないことが示唆された。

よって、フェノール添加による大腸菌の増殖低下を引き起こす要因となる、中心炭素代謝経路の律速反応は、分岐を含む経路全体の ^{13}C 代謝フラックス解析と従来法の *in vitro* 酵素反応測定によって TCA 回路のクエン酸シンターゼの反応であることが示された。また、フェノール添加条件での分岐までの直線状の経路である解糖系における律速反応は、反応速度論モデルを用いた *in vitro* 代謝経路解析による複数酵素の V_{\max} の同時推定によって、フェノール添加なしと変わらず、FBA であることが示された。また、本研究で、大腸菌の解糖系の代謝においては、フェノールの影響は大きくは受けないということが示唆された。

大腸菌におけるフェノール添加濃度変化に対する代謝状態の変化の調査は、生物学的には、近年発展している大腸菌などの微生物由来のフェノールなどの宿主への毒性を示す有機化合物の生産において、宿主微生物の生産物の影響による増殖低下の原因を突き止めた例として意義がある。さらに、本研究は、毒性による増殖低下に対する対策を検討するために有効な研究であると考えられる。大腸菌におけるフェノールの毒性に対する増殖低下の影響の回避には、TCA 回路の活性低下を抑制することが考えられ、律速反応となっていたクエン酸シンターゼの大腸菌における遺伝子発現の微調節や、TCA 回路における中間代謝物質を炭素源に補った培養の検討を行うことが提案される。

解糖系において、PEP から OAA への補充経路の分岐へのフラックス (Meza *et al.*, 2012) は、 ^{13}C 代謝フラックス解析の結果から信頼区間は広いものの、生じる可能性が

ある。しかし、本研究では OAA の定量分析は同時には行えていないため検証することはできない。ただし、この補充反応は、解糖系の最後の PYK の反応において考慮すべき反応であるが、PEP 以前の反応までには影響がないと考えられるため、本研究で対象とした解糖系の経路において FBA を律速反応として同定した結果には問題がないと判断される。今後、本研究で実施した大腸菌の解糖系における *in vitro* 代謝経路解析に関して、OAA を分析対象として定量分析可能とすることで、補充反応も含むように改良できると期待される。

3.5 結言

第 3 章では、 ^{13}C 代謝フラックス解析と従来法の *in vitro* 酵素反応測定によって、フェノールの培地中への添加により大腸菌が増殖低下を引き起こされる原因は、クエン酸シンターゼがフェノールによる阻害を受けるために律速反応となって TCA 回路のフラックスが減少するためであると明らかにできた。さらに、第 2 章の *in vitro* 代謝経路解析による複数酵素の V_{\max} の同時推定法をフェノールの添加の有無における解糖系に適用し、中心炭素代謝経路の上流の解糖系におけるフェノールの影響による律速反応を同定し、律速反応の変化を調査した。フェノール添加条件における大腸菌の中心炭素代謝経路の律速反応の調査では、TCA 回路のクエン酸シンターゼが律速反応であり、解糖系ではフェノールの有無によらず、FBA が律速反応であった。

この一連の解析によって、大腸菌の増殖へ変化を与える化合物であるフェノールが培地中に存在する状況での大腸菌の中心炭素代謝への影響を解析する際には、対象の中心炭素代謝経路全体を分岐の有無によって分割して考えることによって詳細に調べることができることを示すことができた。すなわち、分岐のある経路を対象とした代謝の流れを解析するのに有効な ^{13}C 代謝フラックス解析を用いて、中心炭素代謝経路においてフェノール添加で重要な影響が及ぼされている箇所を特定を行い、さらに加えて、第 2 章で開発した分岐のない直線状の経路である解糖系を対象に複数酵素の V_{\max} 同時推定法による律速反応の同定手法を適用して、推定された V_{\max} の変化、律速反応の変化を調べ、代謝の変動を観察した。結果として、フェノールの添加の有無によって、解糖系の各酵素の V_{\max} の推定値に大きな変化は見られず、律速反応に変化はみられなかったが、中心炭素代謝経路全体における、代謝反応を構成するそれぞれの反応についての酵素活性を詳細に調べ、律速反応を同定することができた。

第 3 章の大腸菌におけるフェノール添加濃度の違いによる代謝状態の変化の調査は、生物学的には、近年発展している大腸菌などの微生物由来のフェノールなどの宿主に毒性を示す有機化合物の生産において、宿主微生物の生産物の影響による増殖低下の原因を突き止めるとともに、また、その対策を検討するために非常に有効な手段である。

代謝工学における微生物を用いた物質生産に対して、代謝経路内での律速反応を同定することは、目的とする最終代謝産物の生産量の増大と生産収率の向上のために、代謝

の改変が必要な箇所を見出すことができる点で非常に重要であり、かつ有効な解析技術である。

第3章では、生物の代謝経路のほとんどがそうであるように、分岐のある代謝経路における律速反応の同定を行った。これまでの¹³C代謝フラックス解析に加えて、従来法の*in vitro*酵素反応測定による検証実験によって確証を得ることで、分岐を含む代謝経路全体における律速反応の同定を行った。さらに、代謝経路の一部分の、分岐までの直線状の経路における律速反応の同定は、第2章で開発した反応速度論モデルを導入した*in vitro*代謝経路解析による複数酵素の V_{\max} の同時推定法によって詳細に調べるという手段を用いた。

手法の一般性という観点から、第3章では、分岐を含む経路全体の律速反応同定を目的とし、完全に従来法の*in vitro*酵素反応測定に依存して地道にすべての酵素の V_{\max} を逐一測定する非常に煩雑な手法に甘んじるのではなく、¹³C代謝フラックス解析によって詳細に V_{\max} を調べるべき酵素反応を抽出して、特定の酵素反応の V_{\max} の調査のためにだけ*in vitro*酵素反応測定を効率よく用いるという手法を提案した。さらにまた、¹³C代謝フラックス解析からだけでは律速反応を同定することが難しい、分岐までの直線状の経路には、第2章の反応速度論モデルを用いた*in vitro*代謝経路解析による複数酵素の V_{\max} の同時推定を行うことで、効率よく複数の酵素の V_{\max} を調べ、律速反応を同定する手法を提案し、第2章の応用例を示した。

第4章 結論と展望

4.1 結果のまとめ

本研究では、対象とする代謝経路を経路内に分岐があるものと分岐がないものの場合分けすることによって、律速反応を同定する手法の開発を行った (図 1-3)。分岐がないものについては第2章で大腸菌の解糖系を例に挙げ、分岐があるものについては、第3章で大腸菌の中心炭素代謝経路全体を例に挙げて示した。通常、代謝経路は分岐があるものであるため、代謝経路全体における律速反応を同定するためには、まず第3章の¹³C代謝フラックス解析と*in vitro*酵素反応測定による手法を用い、その後、対象とする代謝経路内の分岐までの直線状の経路において、第2章の反応速度論モデルを導入した*in vitro*代謝経路解析による複数酵素の V_{\max} 同時推定法を用いた律速反応の同定の手法を用いるという流れである (図 1-3)。

第2章では、反応速度論モデルを導入することで、*in vitro*代謝経路解析によって得られた時系列の代謝物質濃度データから、解糖系の代謝経路内の各酵素の V_{\max} を同時に推定することによって、代謝経路内で最小の V_{\max} をもつ反応を律速反応として同定する手法を構築した。先行研究によって反応速度論モデルの研究が充実している大腸菌の解糖系を対象に、まず、時系列の中間代謝物質濃度のデータから、反応速度論モデルのパラメータのうち V_{\max} のみが未知定数であることを条件に、反応速度論モデルをもとに、それぞれ解糖系前半のPFKと解糖系後半のPGKで、経路内で最小の V_{\max} をとるという仮想実験のデータを2通り生成して、概念実証実験を行った。これら2通りの仮想実験のデータを用いて、複数酵素の V_{\max} の同時推定を行い、仮想実験の条件設定の通りに、それぞれPFKまたはPGKが、解糖系の10酵素反応のうちで最小の V_{\max} をとるかどうかを検証した。概念実証実験の結果、解糖系前半のPFKを最小の V_{\max} として設定した仮想実験1においても、また、解糖系後半のPGKを最小の V_{\max} として設定した仮想実験2においても、それぞれPFKまたはPGKを経路内で最小の V_{\max} をとる反応として推定でき、それぞれ最小の V_{\max} をもつ反応を律速反応として同定することに成功した (図 2-4-2、図 2-5-2)。

仮想実験によって律速反応を同定することに成功したことを受けて、実際の大腸菌粗酵素抽出液を用いた*in vitro*代謝経路解析を実施することで、実際の大腸菌を用いた解糖系の律速反応の同定を行った。8種類の時系列における中間代謝物質の濃度変化のデータから、解糖系の対象10個の酵素の V_{\max} の同時推定を実施し、最小の V_{\max} をとったFBAを律速反応であると同定した (図 2-7)。さらに、*in vitro*および*in vivo*の実験系において解糖系においてFBAが律速反応として同定されたことの妥当性の検証を行った。

*in vitro*実験による検証では、解糖系の*in vitro*代謝経路解析の反応系に、FBAの精製酵素を加えることで、NADHの生産が加速され、解糖系の駆動が促進されることを示し、FBAが律速反応であることを支持する結果を得た (図 2-8)。*in vivo*実験における検

証では、FBA の過剰発現株の定常期による培養を行うことで、増殖が停止している状態の細胞において、コントロール株に比較して FBA の過剰発現株でグルコースの取り込み速度が増加し、律速反応が解除されたことが示された (図 2-9、図 2-11)。また、SDS-PAGE の結果から、FBA の過剰発現株では FBA のタンパク質がコントロール株よりも過剰に発現していることが確認できていた (図 2-10)。これらのことから、第 2 章では、直線状の経路である、大腸菌の解糖系を対象に、仮想実験および、実際の大腸菌の粗酵素抽出液による *in vitro* 代謝経路解析によって、反応速度論モデルを導入した複数酵素の V_{\max} の同時推定を実施し、最小の V_{\max} をもつ反応を律速反応として同定できたと結論づけられた。

第 3 章では、有用であるが大腸菌など生物への毒性が高いフェノールを培地中に添加した際に大腸菌の増殖が低下するという現象に着目し、フェノールを濃度 0%、0.1%、0.15%の条件で、分岐のある経路として、大腸菌の中心炭素代謝経路全体を対象に ^{13}C 代謝フラックス解析を行い(図 3-4、図 3-5、図 3-6)、*in vitro* 酵素反応測定の検証実験を踏まえて律速反応を同定した。*in vitro* 酵素反応測定の検証実験では、添加するフェノール濃度の上昇によって、TCA 回路のクエン酸シンターゼにおいて、阻害ではなく、酵素活性の低下が引き起こされることが分かった (図 3-8 (A))。すなわち、フェノール添加条件における大腸菌の中心炭素代謝経路では、クエン酸シンターゼの反応が律速反応として同定された。

さらに、分岐までの直線経路である解糖系に関して、フェノール濃度 0%と 0.15%において第 2 章で開発した *in vitro* 代謝経路解析による反応速度論モデルを導入した複数酵素の V_{\max} の同時推定手法によって、フェノール添加条件における解糖系の律速反応を調査した。結果として、第 2 章の大腸菌の粗酵素抽出液による解糖系の *in vitro* 代謝経路解析からの律速反応の同定結果と同様に、フェノール添加条件においても FBA が最小の V_{\max} をとり、フェノール添加の有無に関わらず、解糖系では FBA が律速反応であると同定された (図 3-11)。よって、大腸菌が増殖低下を引き起こすフェノール濃度 0.15%の条件においても、解糖系の酵素の V_{\max} にはほとんど影響がないことが示唆され、フェノール添加条件での中心炭素代謝経路の律速反応は、TCA 回路のクエン酸シンターゼであることが示された。

第 2 章では、直線状の経路における律速反応の同定手法を提案し、第 3 章では、分岐を含む代謝経路全体における律速反応の同定手法を提案するとともに、第 2 章の手法を大腸菌の解糖系でのフェノールの添加の有無の条件において応用した例を示した。

4.2 微生物の代謝経路の律速反応の同定に対する本研究の寄与と今

後の展望

微生物の代謝を用いて有用物質生産を効率よく実施することを目的とする代謝工学において、代謝経路の律速反応の同定法の確立は非常に重要である。本研究では、対象の生物種を代謝経路のモデルが構築されている大腸菌の中心炭素代謝経路に限定し、その代謝経路の分岐の有無によって律速反応の同定手法を系統立てて構築することを目的とした。

^{13}C 代謝フラックス解析は、同位体定常を仮定し、代謝経路内での安定同位体標識濃度の変化という物質交換の情報に基づく解析であり、酵素の発現量や反応速度は考慮できず、物質交換の情報がない分岐のない直線状の経路では詳細な解析が難しい反面、分岐箇所でのフラックス分布によって律速反応を推定できる。第3章では分岐のある中心炭素代謝経路を対象に、 ^{13}C 代謝フラックス解析の比較結果を踏まえて律速反応と考えられる酵素反応について *in vitro* 酵素反応測定を実施することで、実際の現象としてのフラックスに変化が生じる原因となる酵素の活性を調べて検証を行い、律速反応を同定することができた。

第2章では、 ^{13}C 代謝フラックス解析では明らかにできなかった、分岐のない直線状の経路を対象に、律速反応の同定手法を構築した。これまでは対象経路内の酵素の V_{\max} の大きさを直接比較するには、代謝経路内の酵素に関して、それぞれ酵素ごとの *in vitro* 酵素反応測定によって、個別に酵素の種類の数だけ逐一実験を行って V_{\max} を求める非常に労力と時間のかかる方法しかなかった。しかし、本研究では、先行研究によって得られている反応速度論モデルを導入して、*in vitro* で代謝経路を駆動させることにより、わずか1回の実験における *in vitro* 反応実験による時系列の中間代謝物質の濃度変化のデータから、代謝経路内の全ての酵素の V_{\max} を同時推定することを可能とする手法を開発した。さらに、この複数酵素の V_{\max} を同時推定で得られた結果によって代謝経路内での最小の V_{\max} をもつ酵素を律速反応として同定することができた。

本研究では、*in vitro* の実験によって、直線状の代謝経路を駆動させ、時系列の中間代謝物質の濃度変化データを取得した。*in vivo* の実験と比べて、*in vitro* の実験のほうが、実験操作や条件設定に利点がある。*in vitro* の実験では、代謝物を測定する際に集菌を必要としないため、迅速なサンプリングや簡便なサンプルの前処理が可能である。また、細胞が取り込むことができない中間代謝物質から代謝経路を *in vitro* で駆動することも可能であるため、*in vitro* で再構成したい代謝経路を自由に分割することができる。

本研究の大腸菌の粗酵素抽出液を用いた *in vitro* 代謝経路解析では、G6P から PYR までの経路を対象にわずか1回の実験で10個の酵素の V_{\max} の同時推定を行った。ただし、この *in vitro* 再構成の実験設計の条件では、最小の V_{\max} をもつ律速反応として同定された FBA の反応以降の酵素に関して推定された V_{\max} の範囲が大きかった。今後、律速反

応以降の酵素反応の V_{\max} の値を、より範囲を狭く限定して推定するために、解糖系の途中の GAP や 3PG を基質として、解糖系後半の経路を別途 *in vitro* で駆動させる実験を加えることが対策案として考えられる。

本研究の特に第 2 章における律速反応の同定手法の適用範囲の限界は、反応速度論モデルが構築されている代謝経路に適用可能な範囲が限定されることである。大腸菌をはじめ、酵母 (Klipp, 2007)、*Clostridium acetobutylicum* (Amador-Noguez *et al.*, 2010; Crown *et al.*, 2011) などの主要な物質生産宿主やモデル微生物の中心炭素代謝経路については反応速度論モデルが報告されているが、多くの生物では酵素の反応速度論に関する知見が乏しい。よって、本研究の手法をそのまま適用するためには、生物種と代謝経路の適用範囲が狭く限定される。しかし、今後、生物工学の研究の発展によって反応速度論モデルの蓄積が期待され、本研究の適用範囲の拡大も期待される。

上記の適用範囲のうち、*in vitro* 再構成の観点での限界は、G6P と NADP を基質に用いることで、ペントースリン酸経路は駆動できる一方で、細胞膜を破碎して調製した粗酵素抽出液を用いた反応系であるため、細胞膜を介する呼吸鎖電子伝達系には適用できないことである。また、大腸菌のグルコース取り込みは、主にヘキソキナーゼではなく、膜結合の酵素複合体によるホストトランスフェラーゼシステムによって行われる。このシステムを *in vitro* で再構成することは困難であるため、グルコースの取り込みを本解析に含めることは現時点では難しいと考えられる。

また、酵母の TCA 回路はミトコンドリアに局在する代謝反応であり、細胞内小器官に局在する代謝経路の *in vitro* 再構成の適用も現時点では難しい。タンパク質の *in vitro* 再構成を含む人工細胞の代謝経路の解析も、本研究の対象とはしていない。また、*in vitro* 再構成が可能な代謝経路のうち、対象の代謝経路に含まれる中間代謝物質の濃度が定量分析可能であることも、本研究の適用に必要な条件である。

本研究の今後の展望としては、次のようなことが挙げられる。本研究の第 2 章では、大腸菌の細胞由来の粗酵素抽出液を用いて解糖系を *in vitro* において駆動させた。この大腸菌の解糖系の酵素の V_{\max} の同時推定においても、様々な課題の解決に活用できると考えられる。今回研究対象とした解糖系は、広く原料に利用されるグルコースからの有用物質生産において、共通して使われる代謝経路である。グルコースは解糖系を經由して PYR や AcCoA などの中間代謝物質に変換され、これらの前駆体から燃料として有用なアルコール、食品添加物や飼料として有用なアミノ酸類、ポリマーやプラスチック原料として有用な有機酸類などが合成される。これら多様な化合物の生産において、解糖系のフラックスを強化することは共通の課題であり、本手法は大腸菌を利用した様々な有用物質生産株について適用することが可能である。また、同じ大腸菌でも菌株の違いや、グリセロールやキシロースなど炭素源の違い、培養時の通気条件の違いによっても、解糖系を触媒する酵素の発現量は異なるため、それぞれの菌株や培養条件における解糖系の複数酵素の V_{\max} の同時推定は、解糖系のフラックスを強化するための有益な知見を提供すると考えられる。

また、適用対象経路を解糖系以外に拡大することができれば、更なる恩恵を享受することができるだろう。例えば、有用物質生産においては、新規に外来の生合成経路を導入することが行われている。本手法を用いることで、この新しい代謝経路の中でどの反応が律速になるかを同定できるようになるかもしれない。ただし、本手法では対象経路の反応速度論モデルがあることが前提であるので、追加したい経路の速度論のパラメータなどの情報を事前に収集することが必要となる。近縁種の生物種などで酵素の速度論パラメータが既知であり、速度論パラメータを入手可能であれば、新規の物質生産用の代謝経路の反応速度論モデルの構築に利用できるかもしれない。さらに、*in vitro* の実験において、代謝物の含量を変化させた豊富な実験データを取得することができれば、 V_{\max} 以外の速度論パラメータも最適化の対象として同時に推定することも可能かもしれない。また、用いることができる代謝物濃度の実験データのばらつき具合などの状態によって、最適化アルゴリズムの選定や工夫が、適宜必要となるとも考えられる。

最後に、本研究で対象とした解糖系は、比較的 *in vitro* での再構成が容易な対象であったが、本手法の適用範囲を拡大するには代謝経路の再構成の可否が課題となる。例えば、真核生物では代謝経路が複数の細胞内小器官にまたがって存在している。ミトコンドリアなどの細胞内小器官について活性を低下させることなく、まるごと抽出できるようになれば、本解析への適用が可能になるかも知れない。同様に、呼吸鎖電子伝達のように細胞膜を介した代謝経路についても現在の技術では *in vitro* での再構成は難しいが、膜タンパクを再構成する技術が進展すれば (Ohta *et al.*, 2016)、膜タンパク質が関与する反応を含む代謝経路も本解析の対象になるであろう。このように、本提案手法は、対象経路の *in vitro* での再構成や反応速度論モデルの必要性によって、現状では適用可能な経路はよく研究されている対象に限られるが、これらの必要条件を満たすことができれば、様々な対象にも拡張の可能性をもつ代謝工学において有効な手法である。

参考文献

Altelaar AF, Munoz J, Heck AJ.: Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet.* 2013; 14(1): 35-48.

Amador-Noguez D, Feng XJ, Fan J, Roquet N, Rabitz H, Rabinowitz JD.: Systems-level metabolic flux profiling elucidates a complete, bifurcated tricarboxylic acid cycle in *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol.* 2010; 192(17): 4452-4461.

Andreozzi S, Chakrabarti A, Soh KC, Burgard A, Yang TH, Van Dien S, Miskovic L, Hatzimanikatis V.: Identification of metabolic engineering targets for the enhancement of 1,4-butanediol production in recombinant *E. coli* using large-scale kinetic models. *Metab Eng.* 2016; 35: 148-159.

Antoniewicz MR, Kelleher JK, Stephanopoulos G.: Determination of confidence intervals of metabolic fluxes estimated from stable isotope measurements. *Metab Eng.* 2006; 8(4): 324-337.

Antoniewicz MR, Kelleher JK, Stephanopoulos G.: Elementary metabolite units (EMU): a novel framework for modeling isotopic distributions. *Metab Eng.* 2007; 9(1): 68-86.

Aono R, Kobayashi H, Joblin KN, Horikoshi K.: Effects of Organic Solvents on Growth of *Escherichia coli* K-12. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994; 58(11), 2009-2014.

Arese P, Bernal V, Charlier D, Iborra JL, Foulquié-Moreno MR, Cánovas M.: Metabolic engineering for high yielding L(-)-carnitine production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2013; 12: 56.

Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH.: Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci.* 2017; 55(2): 182-196.

Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H.: Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.* 2006; 2: 2006.0008.

Bailey JE.: Toward a science of metabolic engineering. *Science* 1991; 252(5013): 1668-75.

Becker J, Rohles CM, Wittmann C.: Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*

for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products. *Metab Eng.* 2018; 50: 122-141.

Beckett D.: Energetic methods to study bifunctional biotin operon repressor. *Methods Enzymol.* 1998; 295: 424-450.

Blangy D, Buc H, Monod J.: Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 1968; 31(1): 13-35.

Brandi A, Giangrossi M, Fabbretti A, Falconi M.: The *hns* Gene of *Escherichia coli* Is Transcriptionally Down-Regulated by (p)ppGpp. *Microorganisms.* 2020; 8(10): 1558.

Brot N, Smit Z, Weissbach H.: Conversion of L-tyrosine to phenol by *Clostridium tetanomorphum*. *Arch Biochem Biophys.* 1965; 112(1): 1-6.

Bujara M, Schümperli M, Pellaux R, Heinemann M, Panke S.: Optimization of a blueprint for *in vitro* glycolysis by metabolic real-time analysis. *Nat Chem Biol.* 2011; 7(5): 271-277.

Castaño-Cerezo S, Pastor JM, Renilla S, Bernal V, Iborra JL, Cánovas M.: An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2009; 8: 54.

Castaño-Cerezo S, Bernal V, Post H, Fuhrer T, Cappadona S, Sánchez-Díaz NC, Sauer U, Heck AJ, Altelaar AF, Cánovas M.: Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol.* 2014; 10(11): 762.

Chassagnole C, Noisommit-Rizzi N, Schmid JW, Mauch K, Reuss M.: Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 2002; 79(1): 53-73.

Chen H, Zhu C, Zhu M, Xiong J, Ma H, Zhuo M, Li S.: High production of valencene in *Saccharomyces cerevisiae* through metabolic engineering. *Microb Cell Fact.* 2019; 18(1): 195.

Chen X, Zhou L, Tian K, Kumar A, Singh S, Prior BA, Wang Z.: Metabolic engineering of *Escherichia coli*: a sustainable industrial platform for bio-based chemical production. *Biotechnol Adv.* 2013; 31(8): 1200-1223.

Cheng KK, Wang GY, Zeng J, Zhang JA.: Improved succinate production by metabolic

engineering. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 538790.

Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, Wishart DS, Xia J.: MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(W1): W486-W494.

Chong J, Wishart DS, Xia J.: Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2019; 68(1): e86.

Costa RS, Machado D, Rocha I, Ferreira EC.: Hybrid dynamic modeling of *Escherichia coli* central metabolic network combining Michaelis-Menten and approximate kinetic equations. *Biosystems.* 2010; 100(2): 150-157.

Crown SB, Antoniewicz MR.: Publishing ¹³C metabolic flux analysis studies: a review and future perspectives. *Metab Eng.* 2013; 20: 42-48.

Crown SB, Indurthi DC, Ahn WS, Choi J, Papoutsakis ET, Antoniewicz MR.: Resolving the TCA cycle and pentose-phosphate pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824: Isotopomer analysis, *in vitro* activities and expression analysis. *Biotechnol J.* 2011; 6(3):300-305.

Dudley QM, Anderson KC, Jewett MC.: Cell-Free Mixing of *Escherichia coli* Crude Extracts to Prototype and Rationally Engineer High-Titer Mevalonate Synthesis. *ACS Synth Biol.* 2016; 5(12): 1578-1588.

Dudley QM, Nash CJ, Jewett MC.: Cell-free biosynthesis of limonene using enzyme-enriched *Escherichia coli* lysates. *Synth Biol (Oxf).* 2019; 4(1): ysz003.

Edirisinghe JN, Faria JP, Harris NL, Allen BH, Henry CS.: Reconstruction and Analysis of Central Metabolism in Microbes. *Methods Mol Biol.* 2018; 1716: 111-129.

Eicher JJ, Snoep JL, Rohwer JM.: Determining enzyme kinetics for systems biology with nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolites.* 2012; 2(4): 818-843.

Emmerling M, Bailey JE, Sauer U.: Glucose catabolism of *Escherichia coli* strains with increased activity and altered regulation of key glycolytic enzymes. *Metab Eng.* 1999; 1(2): 117-127.

Garcia-Albornoz M, Thankaswamy-Kosalai S, Nilsson A, Väremo L, Nookaew I, Nielsen J.: BioMet Toolbox 2.0: genome-wide analysis of metabolism and omics data. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42: W175-181.

Garcia DC, Mohr BP, Dovgan JT, Hurst GB, Standaert RF, Doktycz MJ.: Elucidating the potential of crude cell extracts for producing pyruvate from glucose. *Synth Biol (Oxf).* 2018; 3(1): ysy006.

Goldbeter A.: Oscillatory enzyme reactions and Michaelis-Menten kinetics. *FEBS Lett.* 2013; 587(17): 2778-84.

Grenier F, Matteau D, Baby V, Rodrigue S.: Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BW25113. *Genome Announc.* 2014; 2(5): e01038-14. Published 2014 Oct 16.

Gutowski SJ, Rosenberg H.: Succinate uptake and related proton movements in *Escherichia coli* K12. *Biochem J.* 1975; 152(3): 647-654.

Hamedirad M, Chao R, Weisberg S, Lian J, Sinha S, Zhao H.: Towards a fully automated algorithm driven platform for biosystems design. *Nat Commun.* 2019; 10(1): 5150.

Han MJ, Lee SY.: The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006; 70(2): 362-439.

Hanatani Y, Imura M, Taniguchi H, Okano K, Toya Y, Iwakiri R, Honda K.: *In vitro* production of cysteine from glucose. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019; 103(19): 8009-8019.

Hara KY, Saito M, Kato H, Morikawa K, Kikukawa H, Nomura H, Fujimoto T, Hirono-Hara Y, Watanabe S, Kanamaru K, Kondo A.: 5-Aminolevulinic acid fermentation using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact.* 2019; 18(1): 194.

Harder BJ, Bettenbrock K, Klamt S.: Model-based metabolic engineering enables high yield itaconic acid production by *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2016; 38: 29-37.

He L, Xiao Y, Gebreselassie N, Zhang F, Antoniewicz MR, Tang YJ, Peng L.: Central metabolic responses to the overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* based on ¹³C-metabolic flux analysis. *Biotechnol Bioeng.* 2014; 111(3): 575-585.

Huccetogullari D, Luo ZW, Lee SY.: Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds. *Microb Cell Fact.* 2019; 18(1): 41.

Ingraham, JL., Maaløe, O., Neidhardt, FC.: Growth of the Bacterial Cell. Sunderland, MA, USA: Sinauer. 1983.

Ishii N, Robert M, Nakayama Y, Kanai A, Tomita M.: Toward large-scale modeling of the microbial cell for computer simulation. *J Biotechnol.* 2004; 113(1-3): 281-294.

Ishii N, Suga Y, Hagiya A, Watanabe H, Mori H, Yoshino M, Tomita M.: Dynamic simulation of an *in vitro* multi-enzyme system. *FEBS Lett.* 2007; 581(3): 413-420.

Jahan N, Maeda K, Matsuoka Y, Sugimoto Y, Kurata H.: Development of an accurate kinetic model for the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2016; 15(1): 112.

Julleson D, David F, Pflieger B, Nielsen J.: Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. *Biotechnol Adv.* 2015; 33(7): 1395-1402.

Kajihata S, Furusawa C, Matsuda F, Shimizu H.: OpenMebius: an open source software for isotopically nonstationary ¹³C-based metabolic flux analysis. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 627014.

Keweloh H, Diefenbach R, Rehm HJ.: Increase of phenol tolerance of *Escherichia coli* by alterations of the fatty acid composition of the membrane lipids. *Arch Microbiol.* 1991; 157(1): 49-53.

Keweloh H, Weyrauch G, Rehm HJ.: Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1990; 33(1): 66-71.

Kihira C, Hayashi Y, Azuma N, Noda S, Maeda S, Fukiya S, Wada M, Matsushita K, Yokota A.: Alterations of glucose metabolism in *Escherichia coli* mutants defective in respiratory-chain enzymes. *J Biotechnol.* 2012; 158(4): 215-223.

Kim B, Park H, Na D, Lee SY.: Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of phenol from glucose. *Biotechnol J.* 2014; 9(5): 621-629.

Kim JW, Dang CV.: Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci.* 2005; 30(3):142-150.

Kitagawa M, Ara T, Arifuzzaman M, Ioka-Nakamichi T, Inamoto E, Toyonaga H, Mori H.: Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.* 2005; 12(5): 291-299.

Kitamura S, Toya Y, Shimizu H.: ¹³C-Metabolic Flux Analysis Reveals Effect of Phenol on Central Carbon Metabolism in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2019;10:1010. Published 2019 May 7.

Klipp E.: Modelling dynamic processes in yeast. *Yeast.* 2007; 24(11): 943-959.

Kochanowski K, Volkmer B, Gerosa L, Haverkorn van Rijsewijk BR, Schmidt A, Heinemann M.: Functioning of a metabolic flux sensor in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(3): 1130-1135.

Kumagai H, Yamada H, Matsui H, Ohkishi H, Ogata K.: Tyrosine phenol lyase. I. Purification, crystallization, and properties. *J Biol Chem.* 1970a; 245(7): 1767-1772.

Kumagai H, Yamada H, Matsui H, Ohkishi H, Ogata K.: Tyrosine phenol lyase. II. Cofactor requirements. *J Biol Chem.* 1970b; 245(7): 1773-1777.

Kurata H, Sugimoto Y.: Improved kinetic model of *Escherichia coli* central carbon metabolism in batch and continuous cultures. *J Biosci Bioeng.* 2018; 125(2) :251-257.

Lee SH, Kang KH, Kim EY, Chae TU, Oh YH, Hong SH, Song BK, Jegals J, Park SJ, Lee SY.: Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) based on proteome analysis. *Biotechnol Lett.* 2013; 35(10):1631-1637.

Lee SY, Kim HM, Cheon S.: Metabolic engineering for the production of hydrocarbon fuels. *Curr Opin Biotechnol.* 2015; 33: 15-22.

Lehnen M, Ebert BE, Blank LM.: A comprehensive evaluation of constraining amino acid biosynthesis in compartmented models for metabolic flux analysis. *Metab Eng Commun.* 2017; 5: 34-44.

Leighty RW, Antoniewicz MR.: Parallel labeling experiments with [U-¹³C]glucose validate *E. coli* metabolic network model for ¹³C metabolic flux analysis. *Metab Eng.* 2012; 14(5): 533-541.

Liang S, Chen H, Liu J, Wen J.: Rational design of a synthetic Entner-Doudoroff pathway for enhancing glucose transformation to isobutanol in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2018; 45(3): 187-199.

Liu Y, Nielsen J.: Recent trends in metabolic engineering of microbial chemical factories. *Curr Opin Biotechnol*. 2019; 60: 188-197.

Liu Z, Zhang Y, Jia X, Hu M, Deng Z, Xu Y, Liu T.: *In Vitro* Reconstitution and Optimization of the Entire Pathway to Convert Glucose into Fatty Acid. *ACS Synth Biol*. 2017; 6(4): 701-709.

Masuda A, Toya Y, Shimizu H.: Metabolic impact of nutrient starvation in mevalonate-producing *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*. 2017; 245(Pt B): 1634-1640.

Matsuoka Y, Shimizu K.: Metabolic regulation in *Escherichia coli* in response to culture environments via global regulators. *Biotechnol J*. 2011; 6(11): 1330-1341.

Matsuoka Y, Shimizu K.: Catabolite regulation analysis of *Escherichia coli* for acetate overflow mechanism and co-consumption of multiple sugars based on systems biology approach using computer simulation. *J Biotechnol*. 2013; 168(2): 155-173.

Meza E, Becker J, Bolivar F, Gosset G, Wittmann C.: Consequences of phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and pyruvate kinase isozymes inactivation in central carbon metabolism flux distribution in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2012; 11(1): 127.

Miklóssy I, Bodor Z, Sinkler R, Orbán KC, Lányi S, Albert B.: *In silico* and *in vivo* stability analysis of a heterologous biosynthetic pathway for 1,4-butanediol production in metabolically engineered *E. coli*. *J Biomol Struct Dyn*. 2017; 35(9): 1874-1889.

Nagai H, Masuda A, Toya Y, Matsuda F, Shimizu H.: Metabolic engineering of mevalonate-producing *Escherichia coli* strains based on thermodynamic analysis. *Metab Eng*. 2018; 47: 1-9.

Nishino S, Okahashi N, Matsuda F, Shimizu H.: Absolute quantitation of glycolytic intermediates reveals thermodynamic shifts in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking PFK1 or ZWF1 genes. *J Biosci Bioeng*. 2015; 120(3): 280-286.

Ohta N, Kato Y, Watanabe H, Mori H, Matsuura T.: *In vitro* membrane protein synthesis inside

Sec translocon-reconstituted cell-sized liposomes. *Sci Rep.* 2016; 6: 36466.

Ohtake T, Pontrelli S, Laviña WA, Liao JC, Putri SP, Fukusaki E.: Metabolomics-driven approach to solving a CoA imbalance for improved 1-butanol production in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2017; 41: 135-143.

Okahashi N, Matsuda F, Yoshikawa K, Shirai T, Matsumoto Y, Wada M, Shimizu H.: Metabolic engineering of isopropyl alcohol-producing *Escherichia coli* strains with ¹³C-metabolic flux analysis. *Biotechnol Bioeng.* 2017; 114(12): 2782-2793.

Okano K, Zhu Q, Honda K.: *In vitro* reconstitution of non-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway for lactate production. *J Biosci Bioeng.* 2020; 129(3): 269-275.

Opgenorth P, Costello Z, Okada T, Goyal G, Chen Y, Gin J, Benites V, de Raad M, Northen TR, Deng K, Deutsch S, Baidoo EEK, Petzold CJ, Hillson NJ, Garcia Martin H, Beller HR.: Lessons from Two Design-Build-Test-Learn Cycles of Dodecanol Production in *Escherichia coli* Aided by Machine Learning. *ACS Synth Biol.* 2019; 8(6): 1337-1351.

Orth JD, Thiele I, Palsson BØ.: What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol.* 2010; 28(3): 245-248.

Paliy O, Gunasekera TS.: Growth of *E. coli* BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 73(5): 1169-1172.

Park JO, Rubin SA, Xu YF, Amador-Noguez D, Fan J, Shlomi T, Rabinowitz JD.: Metabolite concentrations, fluxes and free energies imply efficient enzyme usage. *Nat Chem Biol.* 2016; 12(7):482-489.

Park SY, Binkley RM, Kim WJ, Lee MH, Lee SY.: Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level astaxanthin production with high productivity. *Metab Eng.* 2018; 49: 105-115.

Park YH, Lee BR, Seok YJ, Peterkofsky A.: *In vitro* reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2006; 281(10): 6448-6454.

Peng L, Shimizu K.: Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Appl*

Microbiol Biotechnol. 2003; 61, 163-178.

Pitera DJ, Paddon CJ, Newman JD, Keasling JD.: Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2007; 9(2): 193-207.

Pulkkinen O, Metzler R.: Variance-corrected Michaelis-Menten equation predicts transient rates of single-enzyme reactions and response times in bacterial gene-regulation. *Sci Rep.* 2015; 5: 17820.

Ramos JL, Duque E, Gallegos MT, Godoy P, Ramos-Gonzalez MI, Rojas A, Teran W, Segura A.: Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56: 743-768.

Roberts JW.: Promoter-specific control of *E. coli* RNA polymerase by ppGpp and a general transcription factor. *Genes Dev.* 2009; 23(2): 143-146.

Roghanian M, Semsey S, Løbner-Olesen A, Jalalvand F.: (p)ppGpp-mediated stress response induced by defects in outer membrane biogenesis and ATP production promotes survival in *Escherichia coli*. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 2934.

Salas M, Vinuela E, Sols A.: Spontaneous and enzymatically catalyzed anomerization of glucose 6-phosphate and anomeric specificity of related enzymes. *J Biol Chem.* 1965; 240: 561-568.

Sauro HM.: Control and regulation of pathways via negative feedback. *J R Soc Interface.* 2017; 14(127): 20160848.

Schmidt RJ.: Industrial Catalytic Processes—Phenol Production. *Appl Catal A.* 2005; 280, 89-103.

Shams F, Oldfield NJ, Wooldridge KG, Turner DP.: Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA)-a conserved glycolytic enzyme with virulence functions in bacteria: 'ill met by moonlight'. *Biochem Soc Trans.* 2014; 42(6): 1792-1795.

Silva WM, Sousa CS, Oliveira LC, Soares SC, Souza GFMH, Tavares GC, Resende CP, Folador EL, Pereira FL, Figueiredo H, Azevedo V.: Comparative proteomic analysis of four biotechnological strains *Lactococcus lactis* through label-free quantitative proteomics. *Microb*

Biotechnol. 2019; 12(2): 265-274.

Soini J, Ukkonen K, Neubauer P.: High cell density media for *Escherichia coli* are generally designed for aerobic cultivations - consequences for large-scale bioprocesses and shake flask cultures. *Microb Cell Fact.* 2008; 7: 26.

Spedding G, Draper DE.: Allosteric mechanism for translational repression in the *Escherichia coli* alpha operon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(10): 4399-4403.

Srere PA.: Citrate synthase. *Methods Enzymol.* 1969; 13, 3-11.

Stephanopoulos G, Vallino JJ.: Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science.* 1991; 252(5013): 1675-1681.

Takemura T, Chow YL, Todokoro T, Okamoto T, Sato F.: Over-expression of rate-limiting enzymes to improve alkaloid productivity. *Methods Mol Biol.* 2010; 643: 95-109.

Thompson B, Machas M, Nielsen DR.: Engineering and comparison of non-natural pathways for microbial phenol production. *Biotechnol Bioeng.* 2016; 113(8): 1745-1754.

Tokuyama K, Toya Y, Horinouchi T, Furusawa C, Matsuda F, Shimizu H.: Application of adaptive laboratory evolution to overcome a flux limitation in an *Escherichia coli* production strain. *Biotechnol Bioeng.* 2018; 115(6): 1542-1551.

Tokuyama K, Toya Y, Matsuda F, Cress BF, Koffas MAG, Shimizu H.: Magnesium starvation improves production of malonyl-CoA-derived metabolites in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2019a; 52: 215-223.

Tokuyama K, Toya Y, Shimizu H.: Prediction of Rate-Limiting Reactions for Growth-Associated Production Using a Constraint-Based Approach. *Biotechnol J.* 2019b; 14(9): e1800431.

Toya Y, Shimizu H.: Flux analysis and metabolomics for systematic metabolic engineering of microorganisms. *Biotechnol Adv.* 2013; 31(6): 818-826.

Usuda Y, Nishio Y, Iwatani S, Van Dien SJ, Imaizumi A, Shimbo K, Kageyama N, Iwahata D, Miyano H, Matsui K.: Dynamic modeling of *Escherichia coli* metabolic and regulatory

systems for amino-acid production. *J Biotechnol.* 2010; 147(1): 17-30.

Valentini G, Chiarelli L, Fortin R, Speranza ML, Galizzi A, Mattevi A.: The allosteric regulation of pyruvate kinase. *J Biol Chem.* 2000; 275(24): 18145-18152.

van Winden WA, Wittmann C, Heinzle E, Heijnen JJ.: Correcting mass isotopomer distributions for naturally occurring isotopes. *Biotechnol Bioeng.* 2002; 80(4): 477-479.

Vavricka CJ, Hasunuma T, Kondo A.: Dynamic Metabolomics for Engineering Biology: Accelerating Learning Cycles for Bioproduction. *Trends Biotechnol.* 2020; 38(1): 68-82.

Verschueren K.: Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals, 2nd. Edn. New York, NY: Van Nostrand Reinhold. 1983.

Wada K, Toya Y, Banno S, Yoshikawa K, Matsuda F, Shimizu H.: ¹³C-metabolic flux analysis for mevalonate-producing strain of *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng.* 2017; 123(2): 177-182.

Wiechert W.: ¹³C metabolic flux analysis. *Metab Eng.* 2001; 3(3): 195-206.

Wierckx NJ, Ballerstedt H, de Bont JA, Wery J.: Engineering of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 for bioproduction of phenol from glucose. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(12): 8221-8227.

Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, Sajed T, Johnson D, Li C, Karu N, Sayeeda Z, Lo E, Assempour N, Berjanskii M, Singhal S, Arndt D, Liang Y, Badran H, Grant J, Serra-Cayuela A, Liu Y, Mandal R, Neveu V, Pon A, Knox C, Wilson M, Manach C, Scalbert A.: HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1): D608-D617.

Wittmann C.: Fluxome analysis using GC-MS. *Microb Cell Fact.* 2007; 6: 6.

Yu X, Liu T, Zhu F, Khosla C.: *In vitro* reconstitution and steady-state analysis of the fatty acid synthase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(46): 18643-18648.

Zamboni N, Fendt SM, Rühl M, Sauer U.: (¹³C)-based metabolic flux analysis. *Nat Protoc.* 2009; 4(6): 878-892.

Zhang Y, Meng Q, Ma H, Liu Y, Cao G, Zhang X, Zheng P, Sun J, Zhang D, Jiang W, Ma Y.: Determination of key enzymes for threonine synthesis through *in vitro* metabolic pathway analysis. *Microb Cell Fact.* 2015; 14: 86.

Zhang Z, Aboulwafa M, Saier MH.: Regulation of *crp* gene expression by the catabolite repressor/activator, Cra, in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2014; 24(3):135-141.

Zhao J, Shimizu K.: Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on ¹³C-labeled acetate and glucose using GC-MS and powerful flux calculation method. *J Biotechnol.* 2003; 101(2): 101-117.

Zheng Y, Yuan Q, Yang X, Ma H.: Engineering *Escherichia coli* for poly-(3-hydroxybutyrate) production guided by genome-scale metabolic network analysis. *Enzyme Microb Technol.* 2017; 106: 60-66.

Zhu F, Zhong X, Hu M, Lu L, Deng Z, Liu T.: *In vitro* reconstitution of mevalonate pathway and targeted engineering of farnesene overproduction in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 2014; 111(7): 1396-1405.

Zhu J, Shimizu K.: Effect of a single-gene knockout on the metabolic regulation in *Escherichia coli* for D-lactate production under microaerobic condition. *Metab Eng.* 2005; 7(2): 104-115.

Ziveri J, Tros F, Guerrero IC, Chhuon C, Audry M, Dupuis M, Barel M, Korniotis S, Fillatreau S, Gales L, Cahoreau E, Charbit A.: The metabolic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase acts as a transcriptional regulator in pathogenic *Francisella*. *Nat Commun.* 2017; 8(1): 853.

付録

1. 本論文で用いた略語

中間代謝物質およびアミノ酸など

- Glc: グルコース(glucose)
- G6P: グルコース 6-リン酸 (glucose 6-phosphate)
- F6P: フルクトース 6-リン酸 (fructose 6-phosphate)
- FBP: フルクトース 1,6-ビスリン酸 (fructose 1,6-bisphosphate)
- DHAP: ジヒドロキシアセトンリン酸 (dihydroxyacetone phosphate)
- GAP: グルコースアルデヒド 3-リン酸 (glyceraldehyde 3-phosphate)
- PGP: 1,3-ビスホスホグリセリン酸 (1,3-bisphosphoglycerate)
- 3PG: 3-ホスホグリセリン酸 (3-phosphoglycerate)
- 2PG: 2-ホスホグリセリン酸 (2-phosphoglycerate)
- PEP: ホスホエノールピルビン酸 (phosphoenolpyruvate)
- PYR: ピルビン酸 (pyruvate)
- AcCoA: アセチル-Co A (acetyl-CoA)
- Cit: クエン酸 (Citrate)
- IsoCit: イソクエン酸 (isocitrate)
- OAA: オキサロ酢酸 (oxaloacetate)
- α KG: α -ケトグルタル酸 (α -ketoglutarate)
- MAL: リンゴ酸 (malate)
- SUC: コハク酸 (succinate)
- 6PG: 6-ホスホグリセリン酸 (6-phosphoglycerate)
- Ru5P: リブロース-5-リン酸 (ribulose-5-phosphate)
- R5P: リボース-5-リン酸 (ribose- 5-phosphate)
- S7P: セドヘプトロース-6-リン酸 (sedoheptulose-7-phosphate)
- E4P: エリトロース-4-リン酸 (erythrose-4-phosphate)
- Xu5P: キシルロース-5-リン酸 (xylulose-5-phosphate)
- NAD⁺: ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド, 酸化型
(nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized)
- NADH: ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド, 還元型
(nicotinamide adenine dinucleotide, reduced)
- ATP: アデノシン 5'-三リン酸 (adenosine 5'-triphosphate)
- ADP: アデノシン 5'-二リン酸 (adenosine 5'-diphosphate)
- Ala: アラニン (alanine)
- Asx: アスパラギン (asparagine)とアスパラギン酸 (aspartate)の混合物

Glx: グルタミン (glutamine)とグルタミン酸 (glutamate)の混合物
Gly: グリシン (glycine)
Ile: イソロイシン (isoleucine)
Leu: ロイシン (leucine)
Phe: フェニルアラニン (phenylalanine)
Ser: セリン (serine)
Val: バリン (valine)
THF: テトラヒドロフラン (tetrahydrofuran)

代謝酵素

PGI: グルコース-6-リン酸イソメラーゼ (Glucose-6-phosphate isomerase)
PFK: ホスホフルクトキナーゼ (Phosphofructokinase)
FBA: フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ (Fructose-bisphosphate aldolase)
TPI: トリオースリン酸イソメラーゼ (Triosephosphate isomerase)
GAPDH: グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
PGK: ホスホグリセリン酸キナーゼ (Phosphoglycerate kinase)
PGM: ホスホグリセリン酸ムターゼ (Phosphoglycerate mutase)
ENO: エノラーゼ (Enolase)
PYK: ピルビン酸キナーゼ (Pyruvate kinase)
FBPase: フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (Fructose 1,6-bisphosphatase)

2. 大腸菌の解糖系における反応経路とそれらをコードする遺伝子

**Supplementary Table S1: 解糖系の反応とその酵素をコードする
大腸菌の主な遺伝子名**

反応	遺伝子名
PGI	<i>pgi</i>
PFK	<i>pfkA</i>
FBA	<i>fbaB</i>
TPI	<i>tpiA</i>
GAPDH	<i>gapA</i>
PGK	<i>pgk</i>
PGM	<i>pgmA</i>
ENO	<i>eno</i>
PYK	<i>pykF</i>
FBPase	<i>fbp</i>

3. 律速反応推定において対象とした解糖系のモデル

Supplementary Table S2: 動的モデルの微分方程式

微分方程式*

$$\frac{dC_{G6P}}{dt} = -r_{PGI}$$

$$\frac{dC_{F6P}}{dt} = r_{PGI} - r_{PFK} + r_{FBPase}$$

$$\frac{dC_{FBP}}{dt} = r_{PFK} - r_{FBA} - r_{FBPase}$$

$$\frac{dC_{DHAP}}{dt} = r_{FBA} - r_{TPI}$$

$$\frac{dC_{GAP}}{dt} = r_{FBA} + r_{TPI} - r_{GAPDH}$$

$$\frac{dC_{PGP}}{dt} = r_{GAPDH} - r_{PGK}$$

$$\frac{dC_{3PG}}{dt} = r_{PGK} - r_{PGM}$$

$$\frac{dC_{2PG}}{dt} = r_{PGM} - r_{ENO}$$

$$\frac{dC_{PEP}}{dt} = r_{ENO} - r_{PYK}$$

$$\frac{dC_{Pyr}}{dt} = r_{PYK}$$

$$\frac{dC_{NAD}}{dt} = -r_{GAPDH}$$

$$\frac{dC_{NADH}}{dt} = r_{GAPDH}$$

$$\frac{dC_{ATP}}{dt} = -r_{PFK} + r_{PGK} + r_{PYK}$$

$$\frac{dC_{ADP}}{dt} = r_{PFK} - r_{PGK} - r_{PYK}$$

* C は下付き文字で示されている各代謝物の濃度 (mM) を示す。

r は下付き文字で示されている各酵素反応の反応速度 (mmol/mg/min) を示す。

4. 反応速度式とパラメータ

Supplementary Table S3: 動的モデルの反応速度式とパラメータ

反応	反応速度式とそのパラメータ	参考文献
PGI	$r_{\text{PGI}} = \frac{V_{\text{max_PGI}} \cdot \left(C_{\text{G6P}} - \frac{C_{\text{F6P}}}{K_{\text{eq_PGI}}} \right)}{K_{\text{m_PGI_G6P}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{F6P}}}{K_{\text{m_PGI_F6P}}} + C_{\text{G6P}} \right)}$ <p>$K_{\text{eq_PGI}} = 1.44^*$, $K_{\text{m_PGI_G6P}} = 0.00027$ mM, $K_{\text{m_PGI_F6P}} = 3.37$ mM, $V_{\text{max_PGI}}$ (mmol/mg/min)は未知定数</p>	Ishii <i>et al.</i> , 2007, *Kurata and Sugimoto 2018
PFK	$r_{\text{PFK}} = \frac{V_{\text{max_PFK}} \cdot C_{\text{F6P}}^{n_{\text{PFK}}} \cdot C_{\text{ATP}}}{\left(K_{\text{m_PFK_F6P}}^{n_{\text{PFK}}} + C_{\text{F6P}}^{n_{\text{PFK}}} \right) \cdot \left(K_{\text{m_PFK_ATP}} + C_{\text{ATP}} \right)}$ <p>$K_{\text{m_PFK_F6P}} = 0.13$ mM, $K_{\text{m_PFK_ATP}} = 0.12$ mM, $n_{\text{PFK}} = 3.0$, $V_{\text{max_PFK}}$ (mmol/mg/min) は未知定数</p>	Ishii <i>et al.</i> , 2007
FBA	$r_{\text{FBA}} = \frac{V_{\text{max_FBA}} \cdot \left(C_{\text{FBP}} - \frac{C_{\text{GAP}} \cdot C_{\text{DHAP}}}{K_{\text{eq_FBA}}} \right)}{K_{\text{m_FBA_FBP}} + C_{\text{FBP}} + \frac{K_{\text{m_FBA_GAP}} \cdot C_{\text{DHAP}}}{K_{\text{eq_FBA}} \cdot V_{\text{blf}}} + \frac{K_{\text{m_FBA_DHAP}} \cdot C_{\text{GAP}}}{K_{\text{eq_FBA}} \cdot V_{\text{blf}}} + \frac{C_{\text{FBP}} \cdot C_{\text{GAP}}}{K_{\text{m_FBA_GAP_inh}}} + \frac{C_{\text{DHAP}} \cdot C_{\text{GAP}}}{K_{\text{eq_FBA}} \cdot V_{\text{blf}}}$ <p>$K_{\text{eq_FBA}} = 0.144$, $K_{\text{m_FBA_FBP}} = 0.133$ mM, $K_{\text{m_FBA_GAP}} = 0.088$ mM, $K_{\text{m_FBA_DHAP}} = 0.088$ mM, $K_{\text{m_FBA_GAP_inh}} = 0.6$ mM, $V_{\text{blf}} = 2$, $V_{\text{max_FBA}}$ (mmol/mg/min) は未知定数</p>	Chassagnole <i>et al.</i> , 2002
TPI	$r_{\text{TPI}} = \frac{V_{\text{max_TPI}} \cdot \left(C_{\text{DHAP}} - \frac{C_{\text{GAP}}}{K_{\text{eq_TPI}}} \right)}{K_{\text{m_TPI_DHAP}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{GAP}}}{K_{\text{m_TPI_GAP}}} \right) + C_{\text{DHAP}}}$ <p>$K_{\text{eq_TPI}} = 1.39$, $K_{\text{m_TPI_DHAP}} = 2.8$ mM, $K_{\text{m_TPI_GAP}} = 0.3$ mM, $V_{\text{max_TPI}}$ (mmol/mg/min)は未知定数</p>	Chassagnole <i>et al.</i> , 2002

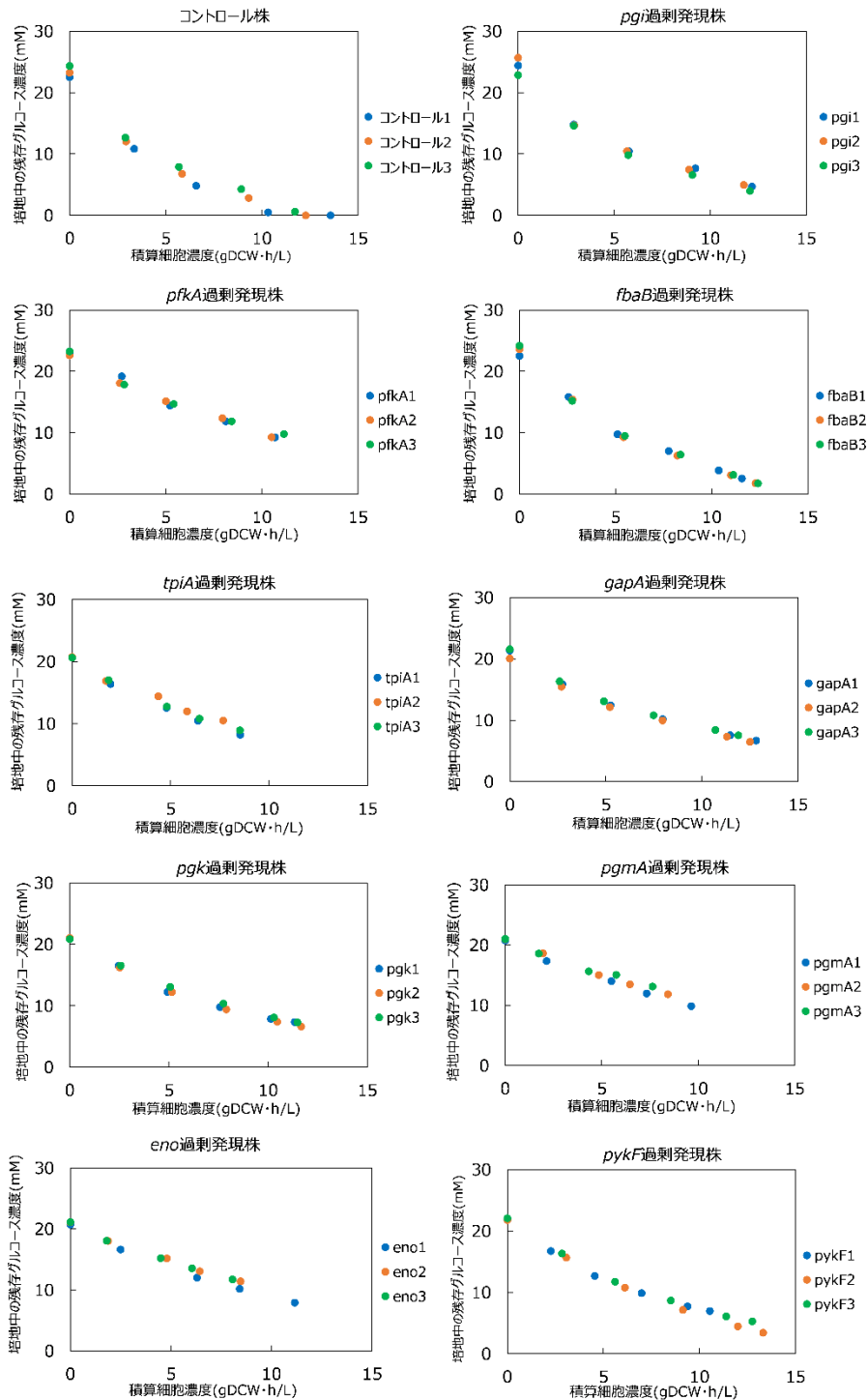
Supplementary Table S3 続き

反応	反応速度式とそのパラメータ	参考文献
GAPDH	$r_{\text{GAPDH}} = \frac{V_{\text{max_GAPDH}} \cdot \left(C_{\text{GAP}} \cdot C_{\text{NAD}} - \frac{C_{\text{PGP}} \cdot C_{\text{NADH}}}{K_{\text{eq_GAPDH}}} \right)}{\left(K_{\text{m_GAPDH_GAP}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{PGP}}}{K_{\text{m_GAPDH_PGP}}} \right) + C_{\text{GAP}} \right) \cdot \left(K_{\text{m_GAPDH_NAD}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{NADH}}}{K_{\text{m_GAPDH_NADH}}} \right) + C_{\text{NAD}} \right)}$ <p> $K_{\text{eq_GAPDH}} = 0.63$, $K_{\text{m_GAPDH_GAP}} = 0.683$ mM, $K_{\text{m_GAPDH_PGP}} = 0.0000104$ mM, $K_{\text{m_GAPDH_NAD}} = 0.252$ mM, $K_{\text{m_GAPDH_NADH}} = 1.09$ mM, $V_{\text{max_GAPDH}}$ (mmol/mg/min)は未知定数 </p>	Chassagnol e <i>et al.</i> , 2002
PGK	$r_{\text{PGK}} = \frac{V_{\text{max_PGK}} \cdot \left(C_{\text{ADP}} \cdot C_{\text{PGP}} - \frac{C_{\text{ATP}} \cdot C_{\text{3PG}}}{K_{\text{eq_PGK}}} \right)}{\left(K_{\text{m_PGK_ADP}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{ATP}}}{K_{\text{m_PGK_ATP}}} \right) + C_{\text{ADP}} \right) \cdot \left(K_{\text{m_PGK_PGP}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{3PG}}}{K_{\text{m_PGK_3PG}}} \right) + C_{\text{PGP}} \right)}$ <p> $K_{\text{eq_PGK}} = 1934.4$, $K_{\text{m_PGK_ADP}} = 0.185$ mM, $K_{\text{m_PGK_PGP}} = 0.0468$ mM, $K_{\text{m_PGK_3PG}} = 0.473$ mM, $K_{\text{m_PGK_ATP}} = 0.653$ mM, $V_{\text{max_PGK}}$ (mmol/mg/min) は未知定数 </p>	Chassagnol e <i>et al.</i> , 2002
PGM	$r_{\text{PGM}} = \frac{V_{\text{max_PGM}} \cdot \left(C_{\text{3PG}} - \frac{C_{\text{2PG}}}{K_{\text{eq_PGM}}} \right)}{K_{\text{m_PGM_3PG}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{2PG}}}{K_{\text{m_PGM_2PG}}} \right) + C_{\text{3PG}}}$ <p> $K_{\text{eq_PGM}} = 0.188$, $K_{\text{m_PGM_3PG}} = 0.2$ mM, $K_{\text{m_PGM_2PG}} = 0.369$ mM, $V_{\text{max_PGM}}$ (mmol/mg/min)は未知定数 </p>	Chassagnol e <i>et al.</i> , 2002

Supplementary Table S3 続き

反応	反応速度式とそのパラメータ	参考文献
ENO	$r_{\text{ENO}} = \frac{V_{\text{max_ENO}} \cdot \left(C_{2\text{PG}} - \frac{C_{\text{PEP}}}{K_{\text{eq_ENO}}} \right)}{K_{\text{m_ENO_2PG}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{PEP}}}{K_{\text{m_ENO_PEP}}} \right) + C_{2\text{PG}}}$	Chassagnol e <i>et al.</i> , 2002
$K_{\text{eq_ENO}} = 6.73$, $K_{\text{m_ENO_2PG}} = 0.1$ mM, $K_{\text{m_ENO_PEP}} = 0.135$ mM, $V_{\text{max_ENO}}$ (mmol/mg/min) は未知定数		
PYK	$r_{\text{PYK}} = \frac{V_{\text{max_PYK}} \cdot C_{\text{PEP}} \cdot \left(\frac{C_{\text{PEP}}}{K_{\text{m_PYK_PEP}}} + 1 \right)^{n_{\text{PYK}}-1} \cdot C_{\text{ADP}}}{K_{\text{m_PYK_PEP}} \cdot \left(L_{\text{PYK}} \cdot \left(\frac{1 + \frac{C_{\text{ATP}}}{K_{\text{m_PYK_ATP}}}}{\frac{C_{\text{FBP}}}{K_{\text{m_PYK_FBP}}} + 1} \right)^{n_{\text{PYK}}} + \left(\frac{C_{\text{PEP}}}{K_{\text{m_PYK_PEP}}} + 1 \right)^{n_{\text{PYK}}} \right) \cdot (C_{\text{ADP}} + K_{\text{m_PYK_ADP}})}$	Chassagnol e <i>et al.</i> , 2002
$K_{\text{m_PYK_PEP}} = 0.31$ mM, $n_{\text{PYK}} = 4$, $K_{\text{m_PYK_ATP}} = 22.5$ mM, $K_{\text{m_PYK_FBP}} = 0.19$ mM, $K_{\text{m_PYK_ADP}} = 0.26$ mM, $L_{\text{PYK}} = 1000$, $V_{\text{max_PYK}}$ (mmol/mg/min)は未知定数		
FBPase	$r_{\text{FBPase}} = \frac{V_{\text{max_FBPase}} \cdot \frac{C_{\text{FBP}}}{K_{\text{m_FBPase_FBP}}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{FBP}}}{K_{\text{m_FBPase_FBP}}} \right)^{n_{\text{FBPase}}-1}}{\left(1 + \frac{C_{\text{FBP}}}{K_{\text{m_FBPase_FBP}}} \right)^{n_{\text{FBPase}}} + \frac{L_{\text{FBPase}}}{\left(1 + \frac{C_{\text{PEP}}}{K_{\text{m_FBPase_PEP}}} \right)^{n_{\text{FBPase}}}}}$	Kurata and Sugimoto 2018
$n_{\text{FBPase}} = 4$, $L_{\text{FBPase}} = 4000000$, $K_{\text{m_FBPase_FBP}} = 0.00892$ mM, $K_{\text{m_FBPase_PEP}} = 0.49$ mM, $V_{\text{max_FBPase}}$ (mmol/mg/min)は未知定数		

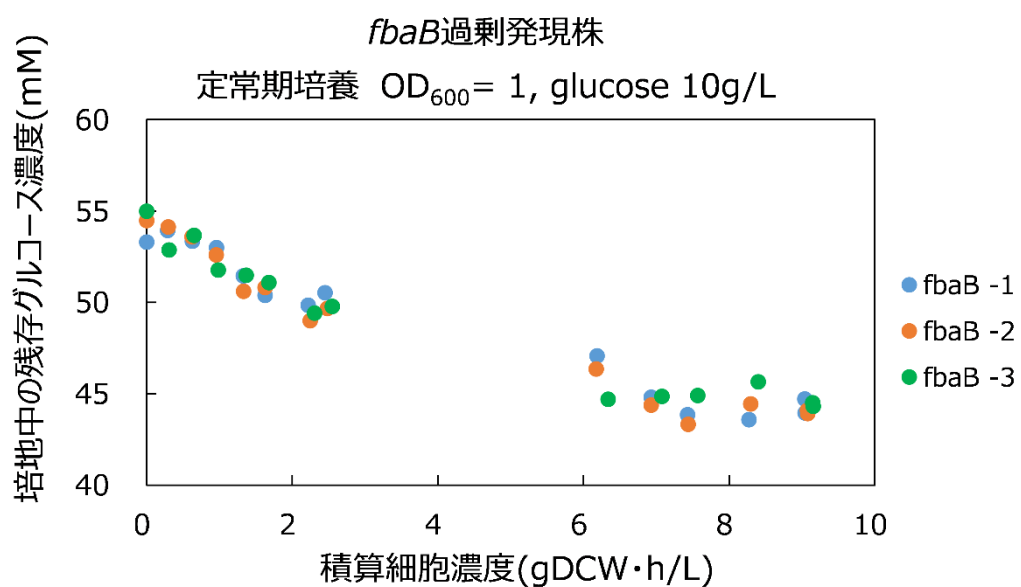
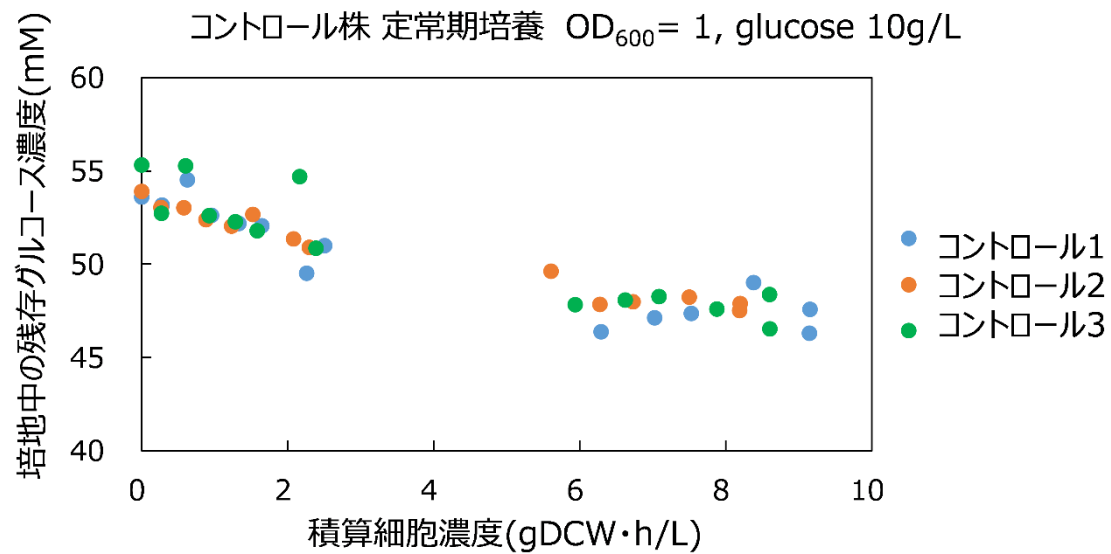
5. 定常期培養の詳細データ (2.3.5)



Supplementary Figure S1:

コントロール株と解糖系の各酵素の遺伝子の過剰発現株における
積算細胞濃度あたりの培養上清中の残存グルコース濃度変化

横軸: 積算細胞濃度 (gDCW·h/L)、縦軸: 培地中に残存するグルコース濃度 (mM)。

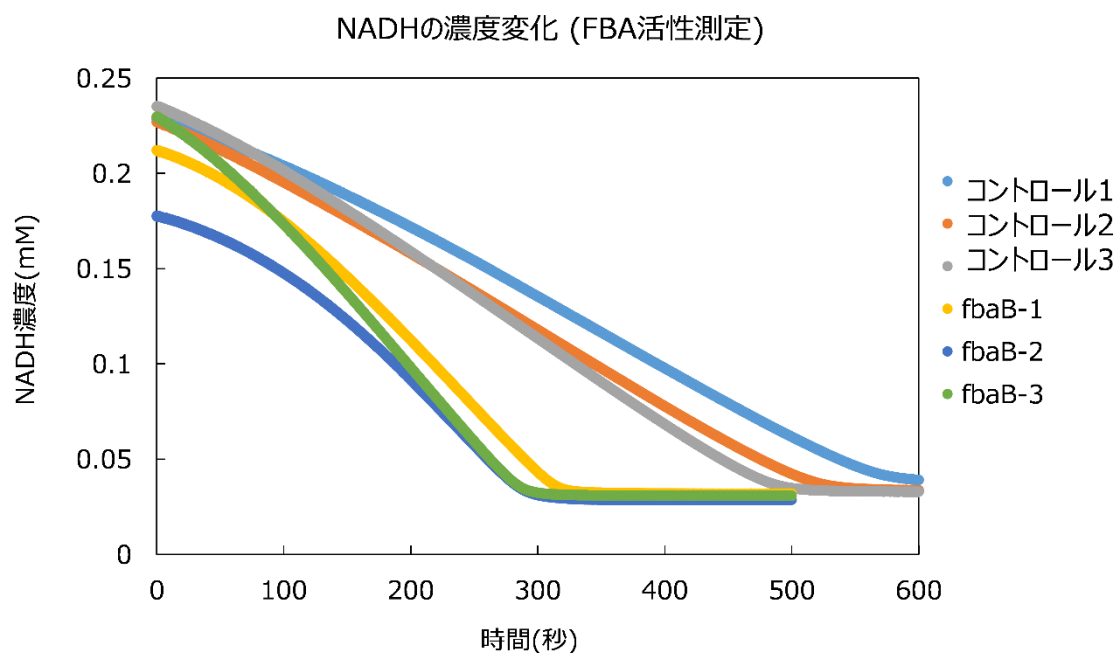


Supplementary Figure S2:

菌体濃度 $OD_{600} = 1$, 10 g/L グルコースを含む培地条件での定常期培養におけるコントロール株と **FBA** 過剰発現株の積算細胞濃度あたりの培養上清中のグルコース濃度変化

横軸: 積算細胞濃度 (gDCW·h/L)、縦軸: 培地中に残存するグルコース濃度 (mM)。

7. 酵素活性測定時の NADH 変化の詳細データ (2.3.5)



Supplementary Figure S3: FBA 活性測定時の NADH 濃度の時系列変化

コントロール株と *fbaB* 過剰発現株の各 3 系列での FBA 活性測定結果。横軸に酵素液を加えて反応を開始させてからの経過時間 (秒) を、縦軸に NADH 濃度 (mM) を示した。FBA 活性測定は TPI と GAPDH の反応をカップリングさせて時間当たりの NADH の減少量を測定する。

8. タンパク質定量の詳細データ (2.3.5)

Supplementary Table S4:

定常期培養時の解糖系の各酵素の過剰発現株の粗酵素抽出液の
総タンパク質濃度と UniProt に掲載されている各酵素の分子量

遺伝子名/株名	UniProt entry ID	分子量 (Da)	総タンパク質濃度 (mg/mL)
コントロール株	-	-	6.79
<i>Pgi</i>	P0A6T1	61,530	6.33
<i>pfkA</i>	P0A796	34,842	5.69
<i>fbaB</i>	P0A991	38,109	5.24
<i>tpiA</i>	P0A858	26,972	4.70
<i>gapA</i>	P0A9B2	35,532	6.56
<i>Pgk</i>	P0A799	41,118	5.41
<i>pgmA</i>	P62707	28,556	5.44
<i>Eno</i>	P0A6P9	45,655	5.45
<i>pykF</i>	P0AD61	50,729	5.68

コントロール株と解糖系の9つの各酵素の過剰発現株 (遺伝子名で表記) から調製できた粗酵素抽出液の総タンパク質濃度は Supplementary Table S4 の通り、4.70 mg/mL から 6.79 mg/mL であり、ほぼ均一な濃度で粗酵素抽出液を得ることができた。これらの粗酵素抽出液を用いて、図 2-10 に示したように SDS-PAGE による各酵素の発現状況の確認を実施した。

9. ¹³C 代謝フラックス解析で用いた代謝モデル (第3章)

Supplementary Table S5: 大腸菌の代謝モデルにおける代謝経路の設定

反応番号	代謝反応	骨格炭素の移動
解糖系		
r1	Subs_Glc --> G6P	ABCDEF --> ABCDEF
r2	G6P --> F6P	ABCDEF --> ABCDEF
r3	F6P --> G6P	ABCDEF --> ABCDEF
r4	F6P --> FBP	ABCDEF --> ABCDEF
r5	FBP --> DHAP + G3P	ABCDEF --> CBA + DEF
r6	DHAP + GAP --> FBP	CBA + DEF --> ABCDEF
r7	DHAP --> GAP	ABC --> ABC
r8	GAP --> DHAP	ABC --> ABC
r9	GAP --> PGP	ABC --> ABC
r10	PGP --> GAP	ABC --> ABC
r11	PGP --> PEP	ABC --> ABC
r12	PEP --> PGP	ABC --> ABC
r13	PEP --> PYR	ABC --> ABC
TCA回路		
r14	PYR --> AcCoA + CO2_in	ABC --> BC + A
r15	AcCoA + OAA --> IsoCit	AB + CDEF --> FEDBAC
r16	IsoCit --> αKG + CO2_in	ABCDEF --> ABCDE + F
r17	αKG --> Sym_SUC + CO2_in	ABCDE --> BCDE + A
r18	Sym_SUC --> MAL	ABCD --> ABCD
r19	MAL --> Sym_SUC	ABCD --> ABCD
r20	MAL --> OAA	ABCD --> ABCD
r21	OAA --> MAL	ABCD --> ABCD
r22	IsoCit + AcCoA --> MAL + Sym_SUC	ABCDEF + GH --> ABHG + FCDE
補充反応		
r23	PEP + CO2_in --> OAA	ABC + D --> ABCD
r24	OAA --> PEP + CO2_in	ABCD --> ABC + D
r25	MAL --> PYR + CO2_in	ABCD --> ABC + D

Supplementary Table S5: 続き

反応番号	代謝反応	骨格炭素の移動
ペントースリン酸経路		
r26	G6P --> 6PG	ABCDEF --> ABCDEF
r27	6PG --> Ru5P + CO2_in	ABCDEF --> BCDEF + A
r28	Ru5P --> Xu5P	ABCDE --> ABCDE
r29	Xu5P --> Ru5P	ABCDE --> ABCDE
r30	Ru5P --> R5P	ABCDE --> ABCDE
r31	R5P --> Ru5P	ABCDE --> ABCDE
r32	R5P + Xu5P --> S7P + GAP	ABCDE + FGHIJ --> FGABCDE + HIJ
r33	GAP + S7P --> Xu5P + R5P	HIJ + FGABCDE --> FGHIJ + ABCDE
r34	GAP + S7P --> F6P + E4P	ABC + DEF GHIJ --> DEFABC + GHIJ
r35	E4P + F6P --> S7P + GAP	GHIJ + DEFABC --> DEF GHIJ + ABC
r36	E4P + Xu5P --> F6P + GAP	ABCD + EFGHI --> EFABCD + GHI
r37	GAP + F6P --> Xu5P + E4P	GHI + EFABCD --> EFGHI + ABCD
エントナー・ドウドロフ経路 (Entner-Doudoroff pathway)		
r38	6PG --> PYR + GAP	ABCDEF --> ABC + DEF
アミノ酸代謝		
r39	PGP --> Ser	ABC --> ABC
r40	Ser --> Gly + THF_in	ABC --> AB + C
r41	Gly + THF_in --> Ser	AB + C --> ABC
CO₂のやり取り		
r42	Subs_CO2 --> CO2_in	A --> A
r43	CO2_in --> [CO2_ex]	
r44	Subs_THF --> THF_in	A --> A
r45	THF_in --> [THF_ex]	
酢酸生産		
r46	AcCoA --> [Acetate]	
バイオマス合成		
r47	G6P --> [Biomass]	

10. 実測 MDV と予測 MDV (第 3 章)

Supplementary Table S6: フェノール添加濃度ごとの実測 MDV と予測 MDV

アミノ 酸	フラグ メント	MDV	フェノール添加濃度						
			0%		0.1%		0.15%		
			実測	予測	実測	予測	実測	予測	
Ala	m_57	M+0	0.588	0.582	0.574	0.565	0.570	0.560	
		M+1	0.401	0.390	0.407	0.402	0.412	0.407	
		M+2	0.011	0.027	0.018	0.032	0.018	0.031	
		M+3	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	
	m_85	M+0	0.599	0.607	0.588	0.599	0.585	0.594	
		M+1	0.396	0.380	0.404	0.385	0.407	0.389	
		M+2	0.005	0.013	0.008	0.016	0.007	0.017	
		M+3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	Asx	m_57	M+0	0.471	0.459	0.489	0.483	0.501	0.493
			M+1	0.421	0.424	0.422	0.421	0.423	0.422
			M+2	0.101	0.106	0.084	0.087	0.073	0.079
			M+3	0.007	0.010	0.005	0.008	0.003	0.006
M+4			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
m_85		M+0	0.517	0.515	0.531	0.531	0.537	0.536	
		M+1	0.414	0.411	0.414	0.408	0.418	0.409	
		M+2	0.066	0.069	0.053	0.058	0.044	0.053	
		M+3	0.002	0.004	0.001	0.003	0.001	0.002	
m_159		M+0	0.512	0.515	0.526	0.531	0.531	0.536	
		M+1	0.408	0.411	0.409	0.408	0.412	0.409	
		M+2	0.071	0.069	0.057	0.058	0.049	0.053	
		M+3	0.010	0.004	0.009	0.003	0.008	0.002	
m_302		M+0	0.740	0.753	0.765	0.776	0.772	0.788	
		M+1	0.240	0.234	0.220	0.213	0.213	0.202	
		M+2	0.019	0.014	0.016	0.011	0.015	0.010	

Supplementary Table S6: 続き

アミノ 酸	フラグメ ント	MDV	フェノール添加濃度					
			0%		0.1%		0.15%	
			実測	予測	実測	予測	実測	予測
Glx	m_57	M+0	0.332	0.313	0.337	0.318	0.336	0.318
		M+1	0.431	0.445	0.437	0.449	0.444	0.451
		M+2	0.203	0.205	0.198	0.201	0.196	0.200
		M+3	0.033	0.034	0.027	0.031	0.023	0.029
		M+4	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002
		M+5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	m_85	M+0	0.368	0.350	0.370	0.348	0.364	0.343
		M+1	0.441	0.455	0.447	0.456	0.453	0.458
		M+2	0.176	0.176	0.173	0.177	0.174	0.180
		M+3	0.015	0.018	0.011	0.018	0.010	0.018
		M+4	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001
	m_159	M+0	0.369	0.350	0.370	0.348	0.365	0.343
		M+1	0.440	0.455	0.446	0.456	0.451	0.458
		M+2	0.175	0.176	0.172	0.177	0.174	0.180
		M+3	0.016	0.018	0.012	0.018	0.010	0.018
M+4		0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	
Gly	m_57	M+0	0.962	0.966	0.962	0.963	0.959	0.959
		M+1	0.037	0.033	0.037	0.036	0.040	0.040
		M+2	0.001	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001
	m_85	M+0	0.981	0.981	0.982	0.982	0.979	0.981
		M+1	0.019	0.019	0.018	0.018	0.021	0.019

Supplementary Table S6: 続き

アミノ 酸	フラグ メント	MDV	フェノール添加濃度					
			0%		0.1%		0.15%	
			実測	予測	実測	予測	実測	予測
Ile	m_85	M+0	0.319	0.313	0.321	0.318	0.321	0.318
		M+1	0.432	0.445	0.437	0.449	0.441	0.451
		M+2	0.214	0.205	0.211	0.201	0.211	0.200
		M+3	0.034	0.034	0.029	0.031	0.026	0.029
		M+4	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002
		M+5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	m_159	M+0	0.318	0.313	0.321	0.318	0.321	0.318
		M+1	0.429	0.445	0.435	0.449	0.439	0.451
		M+2	0.214	0.205	0.212	0.201	0.211	0.200
		M+3	0.035	0.034	0.030	0.031	0.027	0.029
		M+4	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
		M+5	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000
Leu	m_85	M+0	0.256	0.239	0.259	0.235	0.253	0.230
		M+1	0.403	0.429	0.397	0.426	0.397	0.425
		M+2	0.273	0.266	0.274	0.269	0.278	0.273
		M+3	0.066	0.063	0.068	0.066	0.069	0.068
		M+4	0.002	0.004	0.002	0.005	0.002	0.005
		M+5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	m_159	M+0	0.248	0.239	0.250	0.235	0.242	0.230
		M+1	0.400	0.429	0.394	0.426	0.395	0.425
		M+2	0.278	0.266	0.279	0.269	0.284	0.273
		M+3	0.071	0.063	0.073	0.066	0.075	0.068
		M+4	0.003	0.004	0.004	0.005	0.004	0.005
		M+5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Supplementary Table S6: 続き

アミノ 酸	フラグ メント	MDV	フェノール添加濃度					
			0%		0.1%		0.15%	
			実測	予測	実測	予測	実測	予測
Phe	m_57	M+0	0.283	0.270	0.274	0.259	0.268	0.252
		M+1	0.418	0.435	0.415	0.432	0.412	0.430
		M+2	0.243	0.240	0.250	0.247	0.255	0.252
		M+3	0.052	0.051	0.057	0.056	0.060	0.060
		M+4	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006
		M+5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		M+6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		M+7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		M+8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		M+9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	m_85	M+0	0.283	0.274	0.275	0.266	0.271	0.260
		M+1	0.419	0.438	0.415	0.436	0.413	0.434
		M+2	0.243	0.237	0.250	0.243	0.255	0.247
		M+3	0.051	0.048	0.055	0.052	0.057	0.055
		M+4	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004
		M+5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		M+6	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.001	0.000
		M+7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		M+8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		m_159	M+0	0.284	0.274	0.277	0.266	0.273
	M+1		0.418	0.438	0.414	0.436	0.412	0.434
	M+2		0.242	0.237	0.248	0.243	0.253	0.247
	M+3		0.052	0.048	0.056	0.052	0.058	0.055
	M+4		0.004	0.003	0.005	0.004	0.005	0.004
	M+5		0.000	0.000	0.000	0.000	-0.001	0.000
	M+6		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	M+7		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	M+8		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	m_302		M+0	0.974	0.966	0.959	0.956	0.950
		M+1	0.027	0.033	0.040	0.043	0.048	0.051
M+2		0.000	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	

Supplementary Table S6: 続き

アミノ酸	フラグメント	MDV	フェノール添加濃度						
			0%		0.1%		0.15%		
			実測	予測	実測	予測	実測	予測	
Ser	m_57	M+0	0.600	0.607	0.587	0.596	0.580	0.588	
		M+1	0.394	0.381	0.405	0.392	0.410	0.399	
		M+2	0.007	0.012	0.008	0.011	0.010	0.013	
		M+3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	m_85	M+0	0.607	0.617	0.597	0.610	0.590	0.603	
		M+1	0.389	0.377	0.399	0.385	0.406	0.391	
		M+2	0.003	0.006	0.004	0.005	0.005	0.006	
	m_159	M+0	0.608	0.617	0.598	0.610	0.591	0.603	
		M+1	0.391	0.377	0.400	0.385	0.406	0.391	
		M+2	0.001	0.006	0.002	0.005	0.002	0.006	
	m_302	M+0	0.971	0.966	0.969	0.963	0.965	0.959	
		M+1	0.026	0.033	0.028	0.036	0.033	0.040	
		M+2	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	
	Val	m_57	M+0	0.364	0.353	0.352	0.338	0.347	0.333
			M+1	0.458	0.458	0.456	0.458	0.458	0.460
M+2			0.172	0.172	0.182	0.183	0.185	0.187	
M+3			0.006	0.016	0.010	0.020	0.010	0.020	
M+4			0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	
M+5			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
m_85		M+0	0.367	0.369	0.356	0.359	0.351	0.353	
		M+1	0.456	0.461	0.456	0.461	0.457	0.463	
		M+2	0.172	0.160	0.181	0.168	0.184	0.171	
		M+3	0.005	0.010	0.006	0.013	0.007	0.013	
		M+4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
m_159		M+0	0.362	0.369	0.352	0.359	0.347	0.353	
		M+1	0.453	0.461	0.452	0.461	0.455	0.463	
		M+2	0.169	0.160	0.178	0.168	0.180	0.171	
		M+3	0.015	0.010	0.017	0.013	0.016	0.013	
		M+4	0.001	0.000	0.002	0.000	0.001	0.000	
m_302		M+0	0.905	0.909	0.877	0.880	0.874	0.879	
		M+1	0.077	0.087	0.102	0.115	0.106	0.116	
		M+2	0.018	0.004	0.020	0.005	0.020	0.005	

11. ¹³C 代謝フラックス解析の結果の詳細 (第 3 章)

フェノール濃度 0% の場合: 最適解における RSS = 92.1

Supplementary TableS7-1: フェノール濃度 0% の ¹³C 代謝フラックス解析の結果

反応 番号	代謝反応	最適解		95% 信頼区間	
		正味の フラック ス	相対 フラックス (%)	下限値	上限値
r1	Subs_Glc --> G6P	9.40	100.0	9.40	9.40
r2	G6P --> F6P	5.52	58.8	5.37	6.78
r3	F6P --> G6P	0.00	0.0	4.89	8.00
r4	F6P --> FBP	7.54	80.2	-	-
r5	FBP --> DHAP + GAP	7.54	80.2	4.89	8.00
r6	DHAP + GAP --> FBP	0.00	0.0	-	-
r7	DHAP --> GAP	7.54	80.2	4.89	8.00
r8	GAP --> DHAP	0.00	0.0	-	-
r9	GAP --> PGP	15.96	169.7	13.28	16.45
r10	PGP --> GAP	0.00	0.0	-	-
r11	PGP --> PEP	15.07	160.4	12.37	15.60
r12	PEP --> PGP	0.00	0.0	-	-
r13	PEP --> PYR	9.97	106.1	5.68	15.65
r14	PYR --> AcCoA + CO2_in	11.47	122.0	11.10	16.37
r15	AcCoA + OAA --> IsoCit	3.59	38.2	3.00	4.50
r16	IsoCit --> αKG + CO2_in	3.44	36.6	0.90	4.50
r17	αKG --> Sym_SUC + CO2_in	2.81	29.8	0.24	3.88
r18	Sym_SUC --> MAL	2.95	31.4	2.34	3.88
r19	MAL --> Sym_SUC	0.00	0.0	-	-
r20	MAL --> OAA	-0.04	-0.4	-2.16	5.98
r21	OAA --> MAL	0.00	0.0	-	-
r22	IsoCit + AcCoA --> MAL + Sym_SUC	0.15	1.6	0.00	3.60
r23	PEP + CO2_in --> OAA	4.68	49.8	-0.47	6.25
r24	OAA --> PEP + CO2_in	0.00	0.0	-	-
r25	MAL --> PYR + CO2_in	3.14	33.4	1.50	4.50

Supplementary TableS7-1: 続き

反応番号	代謝反応	最適解		95% 信頼区間	
		正味の フラックス	相対 フラックス (%)	下限値	上限値
r26	G6P --> 6PG	3.76	40.0	2.50	3.90
r27	6PG --> Ru5P + CO2_in	3.72	39.6	0.00	3.90
r28	Ru5P --> Xu5P	2.06	21.9	-0.44	2.19
r29	Xu5P --> Ru5P	0.00	0.0	-	-
r30	Ru5P --> R5P	1.66	17.7	0.41	1.74
r31	R5P --> Ru5P	0.00	0.0	-	-
r32	R5P + Xu5P --> S7P + GAP	1.13	12.1	-0.11	1.20
r33	GAP + S7P --> Xu5P + R5P	0.00	0.0	-	-
r34	GAP + S7P --> F6P + E4P	1.13	12.1	-0.11	1.20
r35	E4P + F6P --> S7P + GAP	0.00	0.0	-	-
r36	E4P + Xu5P --> F6P + GAP	0.92	9.8	-0.33	0.99
r37	GAP + F6P --> Xu5P + E4P	0.00	0.0	-	-
r38	6PG --> PYR + GAP	0.03	0.4	0.00	3.90
r39	PGP --> Ser	0.88	9.4	0.85	0.91
r40	Ser --> Gly + THF_in	0.34	3.7	0.33	0.36
r41	Gly + THF_in --> Ser	0.00	0.0	-	-
r42	Subs_CO2 --> CO2_in	0.00	0.0	-	-
r43	CO2_in --> [CO2_ex]	19.89	211.6	15.94	22.12
r44	Subs_THF --> THF_in	-0.34	-3.7	-	-
r45	THF_in --> [THF_ex]	0.00	0.0	-	-
r46	AcCoA --> [Acetate]	6.00	63.9	4.76	8.10
r47	G6P --> [Biomass]	0.59	6.3	0.57	0.61

フェノール濃度 0.1%の場合: 最適解における RSS = 104.5

Supplementary TableS7-2: フェノール濃度 0.1%の ¹³C 代謝フラックス解析の結果

反応 番号	代謝反応	最適解			
		正味の フラックス	0.1% 相対 フラックス (%)	0% 相対 フラックス (%)	(0.1% 相対 フラックス - 0% 相対フ ラックス) (%)
r1	Subs_Glc --> G6P	7.70	100.0	100.0	0.0
r2	G6P --> F6P	4.88	63.4	58.8	4.7
r3	F6P --> G6P	0.00	0.0	0.0	0.0
r4	F6P --> FBP	6.30	81.9	80.2	1.7
r5	FBP --> DHAP + GAP	6.30	81.9	80.2	1.7
r6	DHAP + GAP --> FBP	0.00	0.0	0.0	0.0
r7	DHAP --> GAP	6.30	81.9	80.2	1.7
r8	GAP --> DHAP	0.00	0.0	0.0	0.0
r9	GAP --> PGP	13.24	171.9	169.7	2.2
r10	PGP --> GAP	0.00	0.0	0.0	0.0
r11	PGP --> PEP	12.55	163.0	160.4	2.6
r12	PEP --> PGP	0.00	0.0	0.0	0.0
r13	PEP --> PYR	8.58	111.4	106.1	5.4
r14	PYR --> AcCoA + CO2_in	9.87	128.1	122.0	6.1
r15	AcCoA + OAA --> IsoCit	0.98	12.8	38.2	-25.4
r16	IsoCit --> αKG + CO2_in	0.76	9.9	36.6	-26.7
r17	αKG --> Sym_SUC + CO2_in	0.26	3.4	29.8	-26.4
r18	Sym_SUC --> MAL	0.49	6.3	31.4	-25.1
r19	MAL --> Sym_SUC	0.00	0.0	0.0	0.0
r20	MAL --> OAA	-1.83	-23.8	-0.4	-23.4
r21	OAA --> MAL	0.00	0.0	0.0	0.0
r22	IsoCit + AcCoA --> MAL + Sym_SUC	0.22	2.9	1.6	1.3
r23	PEP + CO2_in --> OAA	3.64	47.3	49.8	-2.5
r24	OAA --> PEP + CO2_in	0.00	0.0	0.0	0.0
r25	MAL --> PYR + CO2_in	2.54	33.0	33.4	-0.3

Supplementary TableS7-2: 続き

反応 番号	代謝反応	最適解			
		正味の フラックス	0.1% 相対 フラックス (%)	0% 相対 フラックス (%)	(0.1% 相対フ ラックス - 0% 相対フラックス) (%)
r26	G6P --> 6PG	2.72	35.3	40.0	-4.6
r27	6PG --> Ru5P + CO2_in	2.68	34.8	39.6	-4.8
r28	Ru5P --> Xu5P	1.45	18.9	21.9	-3.0
r29	Xu5P --> Ru5P	0.00	0.0	0.0	0.0
r30	Ru5P --> R5P	1.22	15.9	17.7	-1.8
r31	R5P --> Ru5P	0.00	0.0	0.0	0.0
r32	R5P + Xu5P --> S7P + GAP	0.81	10.5	12.1	-1.6
r33	GAP + S7P --> Xu5P + R5P	0.00	0.0	0.0	0.0
r34	GAP + S7P --> F6P + E4P	0.81	10.5	12.1	-1.6
r35	E4P + F6P --> S7P + GAP	0.00	0.0	0.0	0.0
r36	E4P + Xu5P --> F6P + GAP	0.64	8.4	9.8	-1.4
r37	GAP + F6P --> Xu5P + E4P	0.00	0.0	0.0	0.0
r38	6PG --> PYR + GAP	0.05	0.6	0.4	0.2
r39	PGP --> Ser	0.69	8.9	9.4	-0.5
r40	Ser --> Gly + THF_in	0.27	3.5	3.7	-0.2
r41	Gly + THF_in --> Ser	0.00	0.0	0.0	0.0
r42	Subs_CO2 --> CO2_in	0.00	0.0	0.0	0.0
r43	CO2_in --> [CO2_ex]	12.47	162.0	211.6	-49.7
r44	Subs_THF --> THF_in	-0.27	-3.5	-3.7	0.2
r45	THF_in --> [THF_ex]	0.00	0.0	0.0	0.0
r46	AcCoA --> [Acetate]	7.31	95.0	63.9	31.1
r47	G6P --> [Biomass]	0.46	6.0	6.3	-0.3

Supplementary TableS7-2: 続き

反応 番号	代謝反応	95% 信頼区間	
		下限値	上限値
r1	Subs_Glc --> G6P	7.70	7.70
r2	G6P --> F6P	4.70	5.71
r3	F6P --> G6P	4.32	6.63
r4	F6P --> FBP	-	-
r5	FBP --> DHAP + GAP	4.32	6.63
r6	DHAP + GAP --> FBP	-	-
r7	DHAP --> GAP	4.32	6.63
r8	GAP --> DHAP	-	-
r9	GAP --> PGP	11.22	13.60
r10	PGP --> GAP	-	-
r11	PGP --> PEP	10.51	12.94
r12	PEP --> PGP	-	-
r13	PEP --> PYR	3.18	10.16
r14	PYR --> AcCoA + CO2_in	9.60	10.80
r15	AcCoA + OAA --> IsoCit	0.50	2.90
r16	IsoCit --> α KG + CO2_in	0.50	2.20
r17	α KG --> Sym_SUC + CO2_in	0.00	1.73
r18	Sym_SUC --> MAL	0.00	2.43
r19	MAL --> Sym_SUC	-	-
r20	MAL --> OAA	-5.60	1.82
r21	OAA --> MAL	-	-
r22	IsoCit + AcCoA --> MAL + Sym_SUC	0.00	1.44
r23	PEP + CO2_in --> OAA	1.93	6.98
r24	OAA --> PEP + CO2_in	-	-
r25	MAL --> PYR + CO2_in	2.00	5.60

Supplementary TableS7-2: 続き

反応 番号	代謝反応	95% 信頼区間	
		下限値	上限値
r26	G6P --> 6PG	1.90	2.90
r27	6PG --> Ru5P + CO2_in	0.00	2.90
r28	Ru5P --> Xu5P	-0.35	1.62
r29	Xu5P --> Ru5P	-	-
r30	Ru5P --> R5P	0.32	1.31
r31	R5P --> Ru5P	-	-
r32	R5P + Xu5P --> S7P + GAP	-0.09	0.89
r33	GAP + S7P --> Xu5P + R5P	-	-
r34	GAP + S7P --> F6P + E4P	-0.09	0.89
r35	E4P + F6P --> S7P + GAP	-	-
r36	E4P + Xu5P --> F6P + GAP	-0.26	0.73
r37	GAP + F6P --> Xu5P + E4P	-	-
r38	6PG --> PYR + GAP	0.00	2.90
r39	PGP --> Ser	0.66	0.72
r40	Ser --> Gly + THF_in	0.26	0.28
r41	Gly + THF_in --> Ser	-	-
r42	Subs_CO2 --> CO2_in	-	-
r43	CO2_in --> [CO2_ex]	9.47	16.75
r44	Subs_THF --> THF_in	-	-
r45	THF_in --> [THF_ex]	-	-
r46	AcCoA --> [Acetate]	5.05	8.96
r47	G6P --> [Biomass]	0.44	0.48

フェノール濃度 0.15%の場合: 最適解における RSS = 103.3

Supplementary TableS7-3: フェノール濃度 0.15%の ¹³C 代謝フラックス解析の結果

反応 番号	代謝反応	最適解			
		正味の フラックス	0.15% 相 対 フラックス (%)	0% 相対 フラックス (%)	(0.15% 相 対フラッ クス - 0% 相対フラ ックス) (%)
r1	Subs_Glc --> G6P	7.10	100.0	100.0	0.0
r2	G6P --> F6P	4.79	67.4	58.8	8.7
r3	F6P --> G6P	0.00	0.0	0.0	0.0
r4	F6P --> FBP	5.97	84.1	80.2	3.9
r5	FBP --> DHAP + GAP	5.97	84.1	80.2	3.9
r6	DHAP + GAP --> FBP	0.00	0.0	0.0	0.0
r7	DHAP --> GAP	5.97	84.1	80.2	3.9
r8	GAP --> DHAP	0.00	0.0	0.0	0.0
r9	GAP --> PGP	12.51	176.2	169.7	6.4
r10	PGP --> GAP	0.00	0.0	0.0	0.0
r11	PGP --> PEP	12.00	169.0	160.4	8.7
r12	PEP --> PGP	0.00	0.0	0.0	0.0
r13	PEP --> PYR	6.45	90.8	106.1	-15.2
r14	PYR --> AcCoA + CO2_in	9.90	139.4	122.0	17.4
r15	AcCoA + OAA --> IsoCit	0.37	5.2	38.2	-33.0
r16	IsoCit --> αKG + CO2_in	0.37	5.2	36.6	-31.4
r17	αKG --> Sym_SUC + CO2_in	0.00	0.0	29.8	-29.8
r18	Sym_SUC --> MAL	0.01	0.1	31.4	-31.4
r19	MAL --> Sym_SUC	0.00	0.0	0.0	0.0
r20	MAL --> OAA	-4.34	-61.1	-0.4	-60.7
r21	OAA --> MAL	0.00	0.0	0.0	0.0
r22	IsoCit + AcCoA --> MAL + Sym_SUC	0.00	0.0	1.6	-1.5
r23	PEP + CO2_in --> OAA	5.31	74.8	49.8	25.0
r24	OAA --> PEP + CO2_in	0.00	0.0	0.0	0.0
r25	MAL --> PYR + CO2_in	4.34	61.2	33.4	27.8

Supplementary TableS7-3: 続き

反応 番号	代謝反応	最適解			
		正味の フラックス	0.15% 相対 フラックス (%)	0% 相対 フラックス (%)	(0.15% 相対 フラックス - 0% 相対フラ ックス) (%)
r26	G6P --> 6PG	2.24	31.6	40.0	-8.4
r27	6PG --> Ru5P + CO2_in	2.17	30.6	39.6	-9.0
r28	Ru5P --> Xu5P	1.21	17.0	21.9	-4.9
r29	Xu5P --> Ru5P	0.00	0.0	0.0	0.0
r30	Ru5P --> R5P	0.97	13.6	17.7	-4.1
r31	R5P --> Ru5P	0.00	0.0	0.0	0.0
r32	R5P + Xu5P --> S7P + GAP	0.66	9.4	12.1	-2.7
r33	GAP + S7P --> Xu5P + R5P	0.00	0.0	0.0	0.0
r34	GAP + S7P --> F6P + E4P	0.66	9.4	12.1	-2.7
r35	E4P + F6P --> S7P + GAP	0.00	0.0	0.0	0.0
r36	E4P + Xu5P --> F6P + GAP	0.54	7.6	9.8	-2.2
r37	GAP + F6P --> Xu5P + E4P	0.00	0.0	0.0	0.0
r38	6PG --> PYR + GAP	0.07	1.0	0.4	0.6
r39	PGP --> Ser	0.51	7.1	9.4	-2.3
r40	Ser --> Gly + THF_in	0.20	2.8	3.7	-0.9
r41	Gly + THF_in --> Ser	0.00	0.0	0.0	0.0
r42	Subs_CO2 --> CO2_in	0.00	0.0	0.0	0.0
r43	CO2_in --> [CO2_ex]	11.48	161.6	211.6	-50.0
r44	Subs_THF --> THF_in	-0.20	-2.8	-3.7	0.9
r45	THF_in --> [THF_ex]	0.00	0.0	0.0	0.0
r46	AcCoA --> [Acetate]	8.54	120.2	63.9	56.4
r47	G6P --> [Biomass]	0.34	4.8	6.3	-1.5

Supplementary TableS7-3: 続き

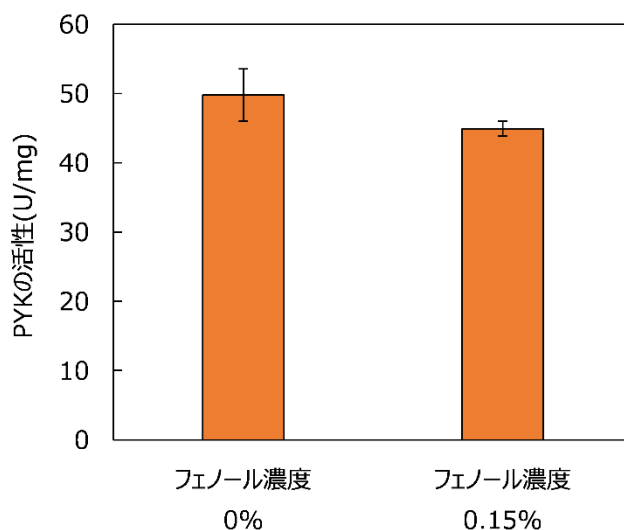
反応 番号	代謝反応	95% 信頼区間	
		下限値	上限値
r1	Subs_Glc --> G6P	7.10	7.10
r2	G6P --> F6P	4.73	5.14
r3	F6P --> G6P	4.45	6.17
r4	F6P --> FBP	-	-
r5	FBP --> DHAP + GAP	4.45	6.17
r6	DHAP + GAP --> FBP	-	-
r7	DHAP --> GAP	4.45	6.17
r8	GAP --> DHAP	-	-
r9	GAP --> PGP	10.97	12.77
r10	PGP --> GAP	-	-
r11	PGP --> PEP	10.45	12.32
r12	PEP --> PGP	-	-
r13	PEP --> PYR	3.39	10.29
r14	PYR --> AcCoA + CO2_in	9.73	10.90
r15	AcCoA + OAA --> IsoCit	0.37	1.80
r16	IsoCit --> α KG + CO2_in	0.35	0.90
r17	α KG --> Sym_SUC + CO2_in	0.00	0.58
r18	Sym_SUC --> MAL	0.00	1.45
r19	MAL --> Sym_SUC	-	-
r20	MAL --> OAA	-5.80	0.99
r21	OAA --> MAL	-	-
r22	IsoCit + AcCoA --> MAL + Sym_SUC	0.00	1.17
r23	PEP + CO2_in --> OAA	1.44	6.80
r24	OAA --> PEP + CO2_in	-	-
r25	MAL --> PYR + CO2_in	1.60	5.80

Supplementary TableS7-3: 続き

反応 番号	代謝反応	95% 信頼区間	
		下限値	上限値
r26	G6P --> 6PG	1.90	2.30
r27	6PG --> Ru5P + CO2_in	0.00	2.30
r28	Ru5P --> Xu5P	-0.25	1.32
r29	Xu5P --> Ru5P	-	-
r30	Ru5P --> R5P	0.22	1.02
r31	R5P --> Ru5P	-	-
r32	R5P + Xu5P --> S7P + GAP	-0.06	0.71
r33	GAP + S7P --> Xu5P + R5P	-	-
r34	GAP + S7P --> F6P + E4P	-0.06	0.71
r35	E4P + F6P --> S7P + GAP	-	-
r36	E4P + Xu5P --> F6P + GAP	-0.19	0.60
r37	GAP + F6P --> Xu5P + E4P	-	-
r38	6PG --> PYR + GAP	0.00	2.30
r39	PGP --> Ser	0.45	0.52
r40	Ser --> Gly + THF_in	0.17	0.20
r41	Gly + THF_in --> Ser	-	-
r42	Subs_CO2 --> CO2_in	-	-
r43	CO2_in --> [CO2_ex]	9.87	14.62
r44	Subs_THF --> THF_in	-	-
r45	THF_in --> [THF_ex]	-	-
r46	AcCoA --> [Acetate]	6.91	9.65
r47	G6P --> [Biomass]	0.30	0.35

12. フェノール添加における大腸菌コントロール株の PYK 活性

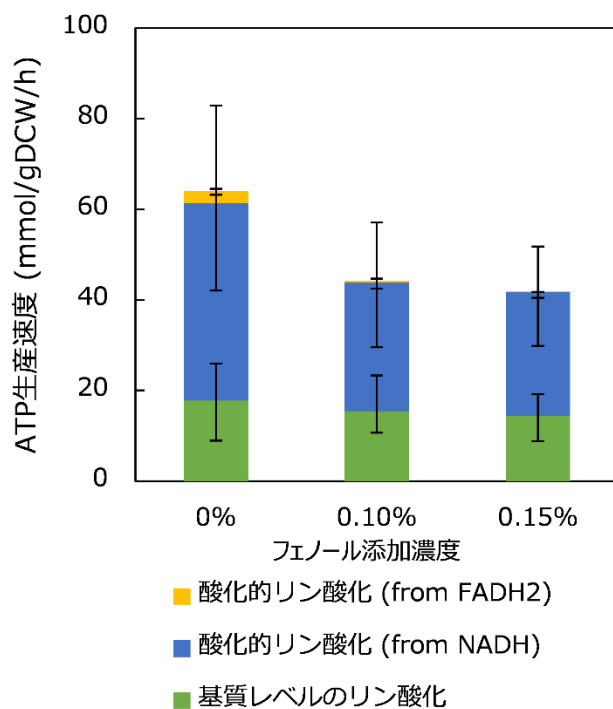
(第3章 3.3.5)



Supplementary Figure S4: 大腸菌コントロール株の PYK 活性の フェノール濃度 0%と 0.15%の比較

横軸にフェノール添加濃度を、縦軸に PYK の活性 (U/mg) を示した。大腸菌コントロール株 AG1 株を培地中にフェノールを添加せずに培養して回収した菌体から調製した粗酵素抽出液を用いて、PYK の *in vitro* 酵素反応測定を行った。培養時にはフェノールは添加しないが、PYK の *in vitro* 酵素反応測定時に、各条件に合わせた濃度のフェノールを添加して実験を行った。各フェノール濃度における *in vitro* 酵素反応測定は 3 重測定で実施した。p < 0.05 において両側 t-検定でフェノール濃度 0%、0.15%の間に有意差は見られなかった。

13. フラックス分布に基づく ATP 再生量の算出 (第3章 3.4 考察)



Supplementary Figure S5: フェノール添加濃度による ATP 生産速度の変化

横軸に培地中へのフェノール添加濃度を、縦軸に ATP 生産速度 (mmol/gDCW/h) を示した。第3章での ^{13}C 代謝フラックス解析によって得られたフラックス分布に基づいて ATP 再生量をフェノール添加濃度条件ごとに算出した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、博士後期課程入学にあたって相談させていただいた当時から、社会人を経てブランクがありながらの博士後期課程の学生生活開始に向けて温かく迎えてくださり、博士後期課程の3年+ α の期間、研究と博士論文執筆の機会と場を与えてくださり、たくさんご面倒をおかけしたにも関わらず、終始温かくご指導とご助言をしてくださいました、大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻代謝情報工学講座、清水浩教授に、心より感謝申し上げます。博士論文審査委員として、また、博士後期課程のバイオ情報工学専攻における発表の機会に折々にふれて、有益なご助言、ご指導をいただ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バイオ情報計測学講座、松田史生教授に心より感謝申し上げます。博士論文審査委員として、また、博士後期課程のバイオ情報工学専攻における発表の機会に有益なご助言、ご指導をいただ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小蔵正輝准教授、古川正紘准教授に心より感謝申し上げます。博士後期課程のバイオ情報工学専攻における発表の機会に、有益なご助言、ご指導をいただ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、若宮直紀教授、瀬尾茂人准教授に心より感謝申し上げます。また、研究室における研究活動でさまざまご協力やご指導をいただきました、大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻代謝情報工学講座の二井手哲平助教、豊島正和特任助教、阪田真澄技術補佐員、石橋真衣技術補佐員に心より感謝申し上げます。研究室生活における活動で事務的な面でさまざまにサポートしていただき、温かく見守ってくださった大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻代謝情報工学講座の事務員さんである、石原かおりさん、嘉藤田裕美さんに心よりお礼申し上げます。また、博士後期課程入学時から研究室での実験やその他について教えてくださり、たくさんサポートして下さった、大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻代謝情報工学講座の妹尾幸枝さん(卒業生)、森田啓介博士(卒業生)、徳山健斗博士(卒業生)、小川健一博士(卒業生)、鎌田健太郎さん(卒業生)、荒木千絵さん(卒業生)、後野直哉さん(卒業生)、上原ひかるさん(卒業生)、西口大貴さん(卒業生)、木村陸さん(卒業生)に心より感謝申し上げます。特に森田さんと小川さんには博士後期課程3年次の報告会や博士論文についてのアドバイスをいただきました。博士後期課程2年次に中国から招聘教員として来られていた施欣馳さんには研究室での活動で大変お世話になり、京都観光やお花見などのイベントをすることができ、楽しい思い出を残すことができました。また、同様に、後期課程2年次に米国からの招聘教員として来られていた、イリノイ大学のYong-Su Jin教授には英語でのディスカッションの場をいただき、非常によい刺激を得ることができました。心よりお礼申し上げます。博士後期課程の修了年度のコロナ禍において、研究活動を共にしていただいた、川井隆太郎さん、楠田みのりさん、田中涼さん、山本千晶さん、矢島正和さん、佐野海瑚人さん、

澤田将吾さん、田島遼太郎さん、塚本雅士さん、三吉健太さん、赤木駿斗さん、上野航一郎さん、杉木創さん、田中恒作さん、中田美波さん、松山千夏さん、村上茉奈美さんに心より感謝申し上げます。博士後期課程で同じ時期に研究室に在籍され、学位取得に向けて発表会などで議論し、研究内容へのインスピレーションをくださった、社会人博士の野口真悟さんに心より感謝申し上げます。その他、大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学でお世話になった方々皆様に心よりお礼申し上げます。

最後に、大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻代謝情報工学講座の戸谷吉博准教授には、ブランクがありながらも博士後期課程への進学を後押ししてくださり、経済的にもサポートをしていただき、研究室での活動においてウェットの実験やドライの解析における細かな面からアドバイスをいただき、また、夫として研究活動が忙しい時期には家庭におけるサポートもしていただき、博士論文を執筆できるまでにこぎつけることができましたことを心より感謝申し上げます。研究活動を応援し、見守り、支えてくれた両親と、妹、弟、研究活動が忙しい時期には特に大変な思いをさせてしまい、また、逆にたくさん協力と応援をしてくださった、大切なかけがえのない息子である戸谷和裕さんに心より感謝申し上げます。