OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マルチオミクス解析によるStreptomyces coelicolorにおける抗生物質生産へのcAMPの影響に関する研究
Author(s)	新田, 克章
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/85280
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士学位論文

マルチオミクス解析による *Streptomyces coelicolor* における抗生物質生産への cAMP の影響の解析に関する研究

新　田　克　章

2021 年 03 月

大阪大学大学院工学研究科

目次

第一章 緒論 1

1.1 *Streptomyces* 属による抗生物質生産 1

1.2 *Streptomyces* 属における抗生物質生産の制御機構解明の重要性 3

1.3 *Streptomyces coelicolor* における抗生物質生産の制御機構 4

1.4 オミクス解析 10

1.5 *Streptomyces* 属へオミクス解析適用における現状 13

1.6 本研究の目的，戦略および立ち位置 15

第二章　抗生物質生成能の異なる放線菌 *Streptomyces coelicolor* のオミクス解析 19

2.1 緒言 19

2.2 実験材料および実験方法 20

2.2.1 LC-MS/MS に使用した試薬 20

2.2.2 *Streptomyces coelicolor* の培養条件 20

2.2.3 菌体および培養液サンプルの回収 23

2.2.4 アクチノロージンの定量 23

2.2.5 培地成分の定量 24

2.2.6 メタボローム解析に向けた回収試料の前処理 24

2.2.7 LC-QqQ MS による一次代謝物の相対定量，そのデータ解析および統計解析 25

2.2.8 U-^{13}C 標識体の抽出 28

2.2.9 LC-QqQ MS による一次代謝物の絶対定量，データ解析および代謝物添加回収試験 28

2.2.10　RNA 抽出・精製および品質確認 30

2.2.11　rRNA 除去，cDNA ライブラリーの作成およびシークエンシング(RNAseq) 32

2.2.12 RNAseq 生データのマッピング処理およびリードカウント 33

2.2.13 RNAseq データの統計解析 33

2.3 結果と考察 34

2.3.1 *Streptomyces coelicolor* M1146 株の表現型 34

2.3.2 *Streptomyces coelicolor* M1146 株の一次代謝物絶対定量 36

2.3.3 *Streptomyces coelicolor* M1146 株の経時変化トランスクリプトーム解析 40

2.3.4　アクチノロージン生産量の異なる *Streptomyces coelicolor* の表現型の比較 43

2.3.5 アクチノロージンの生産量の異なる *Streptomyces coelicolor* のメタボローム解析 .52

2.3.6　アクチノロージンの合成の有無によるトランスクリプトームへの影響の解析 58

2.4 小括 65

第三章　放線菌 *Streptomyces coelicolor* における cAMP 添加のマルチオミクス解析 66

3.1 緒言 66

3.2　実験材料および実験方法 69

3.2.1 LC-MS/MS 分析に使用した試薬 69

3.2.2 *Streptomyces coelicolor* の培養条件 69

3.2.3 菌体および培養液サンプルの回収 69

3.2.4 アクチノロージンの定量 69

3.2.5 メタボローム解析に向けた前処理 69

3.2.6 LC-QqQ MS による代謝物の相対定量およびその統計解析 69

3.2.7 抗生物質の酢酸エチルによる抽出 69

3.2.8 LC-Q-TOF MS による抗生物質の分析 69

3.2.9 RNA の抽出・精製および品質確認 71

3.2.10 rRNA 除去，cDNA ライブラリーの作成およびシークエンシング(RNAseq) 71

3.2.11 RNAseq 生データのマッピング処理およびリードカウント 71

3.2.12 cAMP の添加 71

3.2.13 7-methylguanine および 7-methylguanosine の添加 71

3.3 結果と考察 72

3.3.1 *Streptomyces coelicolor* への cAMP の添加による表現型の変化 72

3.3.2 *Streptomyces coelicolor* における cAMP の添加によるアクチノロージン合成遺伝子発現量変化 77

3.3.3 アクチノロージンの生産株／非生産株への cAMP の添加によるメタボロームへの影響 78

3.3.4 アクチノロージンの非生産株への cAMP の添加によるトランスクリプトームへの影響 81

3.3.5 阻害剤 7-methylguanine および 7-methylguanosine の添加，および本試験系への cAMP の添加 86

3.4 小括 88

第四章　総括と展望 89

引用文献.....95

発表論文.....103

学会発表(国内・国外).....104

謝辞.....106

補足資料.....108

略号

AICAR: 5-Amino-4-imidazolecarboxamide aminoimidazole 5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボチド

APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization 大気圧化学イオン化法

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

CCR: Carbon catabolite repression カーボンカタボライト抑制

CE: Collision Energy 衝突エネルギー

CRP: cAMP receptor protein cAMP 受容体タンパク

DCW: Dry Cell Weight 乾燥菌体重量

DEG: Differential Expressed Gene 発現変動遺伝子

DL: De-solvent Line 脱溶媒管

DUIS: Dual Ion Source デュアルイオンソース

ESI: Electrospray Ionization エレクトロスプレーイオン化法

FDR: False Discovery Rate 擬陽性確率

FC: Fold-change 倍率変化

GSEA: Gene Set Enrichment Analysis 遺伝子セット濃縮解析

HCA: Hierarchical Cluster Analysis 階層的クラスリング解析

IS: Internal Standard 内部標準物質

LC: Liquid Chromatography 液体クロマトグラフィー

MRM: Multiple Reaction Monitoring 多重反応モニタリング

MS/MS: Tandem mass spectrometry タンデム質量分析計

m/z: Mass charge ratio 質量電荷比

PFPP: Pentafluorophenylpropyl ペンタフルオロフェニルプロピル

PKA: Protein kinase A プロテインキナーゼ A

QqQ MS: Triple quadrupole mass spectrometer 三連四重極型質量分析計

Q-TOF MS: Quadrupole-Time Of Flight mass spectrometer 四重極-飛行時間型質量分析計

RT: Retention Time 保持時間

SFM: Soy Flour Mannitol

TBA: Tri Butyl Amine トリブチルアミン

TPM: Transcripts per million

メタボローム解析における代謝物の略称は全て補助資料における図表 S1 に記載する

第一章 緒論

1.1 *Streptomyces* 属による抗生物質生産

Strepotmyces 属は DNA 塩基配列において GC 含有率の高いグラム陽性菌に分類される[1]．ゲノムサイズは 約 8 Mbp ほどであり[1]，大腸菌や枯草菌の約 4 Mbp ほどのゲノムサイズと比較すると約 2 倍ほどであることから *Streptomyces* 属に見られる複雑な形態分化や二次代謝の制御機構を担っていると考えられている[1]．*Streptmyces* 属は抗真菌薬 Natamycin[2,3]，抗寄生虫薬 Avermectin[4,5,6]，抗腫瘍薬 Mitomycin[7,8] や免疫抑制剤 Tacrolimus[9,10] などの生産源であるが，*Streptomyces* 属における主な生産物質は抗生物質である．1944 年に Waksman らによって *Streptomyces griseus* から Streptomycin[11] が単離されて以来，多くの抗生物質が *Streptomyces* 属から単離されてきており[1] (図 1-1)，現在までに発見されている抗生物質の多くを *Streptomyces* 属が生産している[12]．多種多様な抗生物質が発見された現在において，細菌感染による感染症は過去の産物のように思えるが，薬剤耐性が問題視されて久しい現状では，新たな抗生物質の発見が未だ必要とされている[13]．そうした現状において，現在までに発見された多くの抗生物質生産を担う *Streptomyces* 属は新規抗生物質の発見において重要な存在であるが[14]，*Streptomyces* 属に属する各菌株における新規抗生物質の生産の可否を評価するためには，それらの株における抗生物質合成遺伝子クラスターの有無の予測が必要となる．そこで *Streptomyces* 属の各菌株における抗生物質合成遺伝子クラスターの有無の予測に必須となるのがそれぞれの菌株のゲノムの塩基配列情報である．現在では，1600 種以上の *Streptomyces* 属のゲノム情報が NCBI (National Center for Biotechnology Information) データベースに登録されており, そのうち 189 種の *Streptomyces* 属の全ゲノムシークエンスが終了している[15]．新たに解析されたゲノムにおける二次代謝物合成遺伝子クラスターの有無の予測つまり“捜索”は”ゲノムマイニング”と称されており[16]，AntiSMASH (Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis SHell)[17,18,19,20,21] などの

ソフトウェアを用いたゲノムマイニングが盛んに行われている． *Streptomyces* 属におけるゲノムマイニングの結果，*Streptomyces* 属のゲノムには平均で 30 ほどの二次代謝物合成を担う遺伝子クラスターが存在していると言われており [15]，特定した抗生物質合成遺伝子クラスターの異種生合成遺伝子導入などの技術を通じて，新たな抗生物質が発見されてきた．加えて近年では，質量分析計などの分析技術の発展により，新規抗生物質の検出およびその構造決定を達成した例 [22] も報告されてきている．上記の点から，*Streptomyces* 属は今後においても新規抗生物質の更なる発見において重要な生産源として期待されている [23].

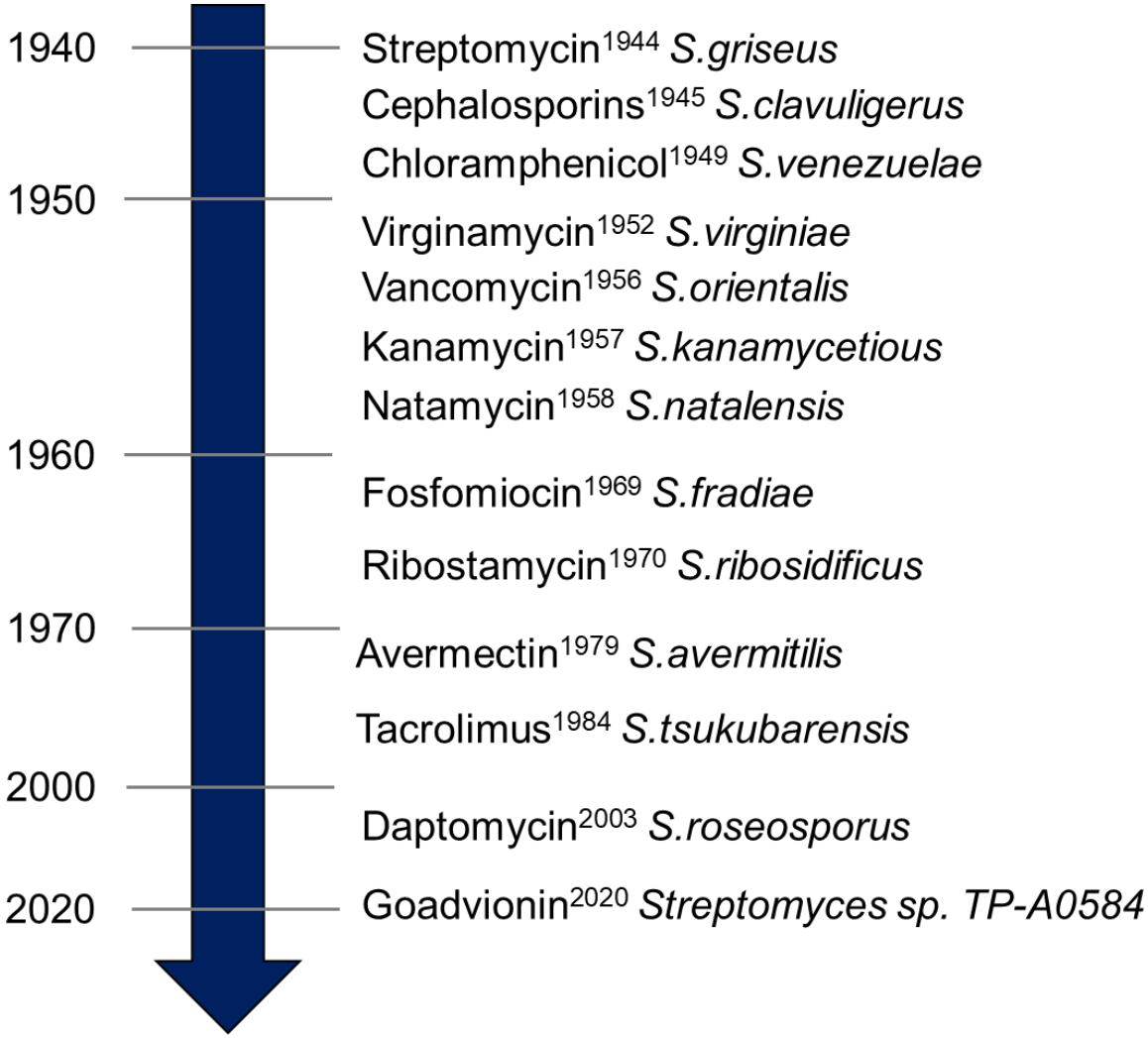


図 1-1 *Streptomyces* 属による抗生物質発見の歴史

1.2 *Streptomyces* 属における抗生物質生産の制御機構解明の重要性

1.1 で述べたゲノム配列情報を用いたゲノムマイニングによって新たな抗生物質合成遺伝子クラスターが同定されたとしても，常にその抗生物質が合成されるわけではない．多くの抗生物質は合成酵素をコードする遺伝子がゲノム上に存在しているのにも関わらず，通常の培養条件下では生産されることは無く，ゲノム上で『休眠』していると表現される [24]．また，工業的生産のためには生産性向上が欠かせないため，抗生物質生産能の更なる増強が必要とされる [25]. いくつかの抗生物質は培養後期において，培地成分が枯渇することによって引き起こされる緊縮応答 (Stringent response) によって生産が開始されるが [26]，全ての抗生物質がこの緊縮応答のみによって合成が開始されるわけではないことから，休眠している遺伝子の活性化の困難さが問題視されている．本問題の解決のため，現在までにも，突然変異株のスクリーニング [27]，抗生物質生産経路を制御する制御遺伝子の活性化 [28]，異種生合成遺伝子導入 [29]，他微生物との共培養 [30]，抗菌剤耐性スクリーニングを行うリボソーム工学 [31] または物質添加による培地の改変 [32] などの手法を用いることで休眠中の抗生物質合成遺伝子の活性化および *Streptomyces* 属の抗生物質生産能の向上を達成し，新規抗生物質の発見や抗生物質の生産性の向上を達成した研究が報告されている (図 1-2)．こうした研究を通じて，新規抗生物質の発見や生産量増大を達成すると同時に抗生物質生産を制御する機構の解明が進められてきており，そういった知見から，抗生物質生産に関連する制御機構を解明することは，新規抗生物質の発見および抗生物質生産量向上を達成する際に有効であると示されてきた.

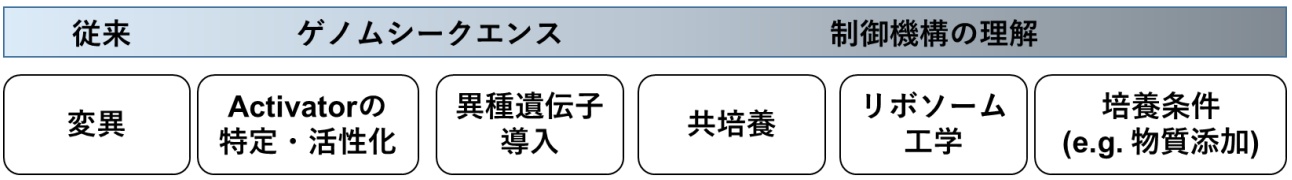


図 1-2 休眠抗生物質合成遺伝子の活性化および抗生物質生産量増産のための手法

1.3 *Streptomyces coelicolor* における抗生物質生産の制御機構

Streptomyces coelicolor は Actinorhodin (図 1-3A), Undecylprodigiosin, Coelymicin P1 などの色を呈する抗生物質を生産することが可能であることから [33]，遺伝子改変による抗生物質の生産の有無の変化や培地改変による抗生物質生産の時期の変化を容易に特定することが可能である．そのため *S.coelicolor* は *Streptomyces* 属を対象とした研究において学術的に有用な研究対象となっており [34]，現在までに抗生物質生産の制御機構に関する多くの研究がこの *S. coelicolor* をモデル株とすることで行われてきた [33]．*S.coelicolor* は *Streptomyces* 属の中でも最初に全ゲノム配列が決定された菌株であり [35]，ゲノム長は 8,667,507 bp (図 1-3B)であることが示された．またその際に，*S. coelicolor* のゲノムには，主に外部刺激やストレスへの応答に関与している制御遺伝子が多く含まれていることが予測され，*S. coelicolor* の複雑な生体機構に関連している可能性が提唱された [35]．

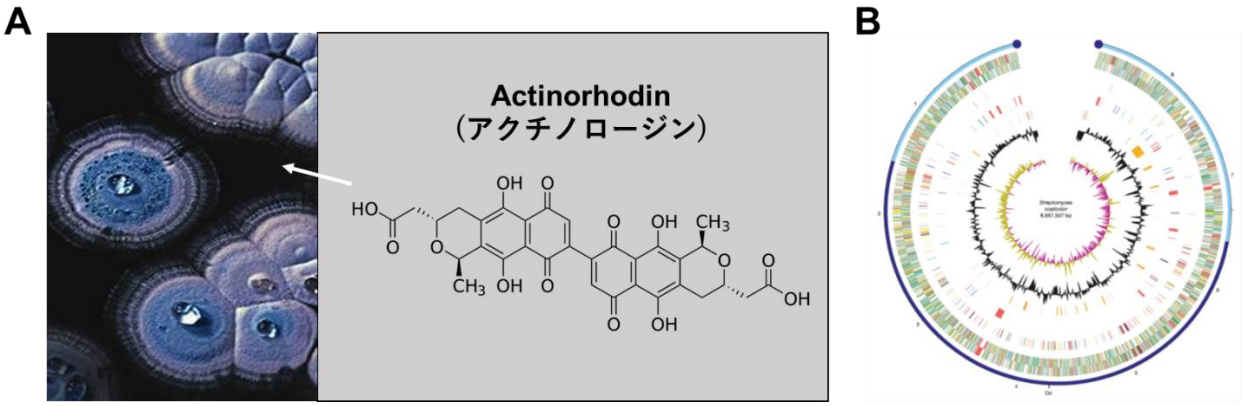


図 1-3 *S.coelicolor* に関する情報　(出典：S. D. Bentley *et al*., 2002, Nature)
(A) *S.coelicolor* の固体培地における菌糸体写真およびアクチノロージンの構造
(B) *S.coelicolor* のゲノム情報

ゲノムシークエンス後のポストゲノム時代において、*S. coelicolor* においても二次代謝物合成遺伝子クラスターのゲノムマイニングが行われ，その結果，*S. coelicolor* のゲノム中には，表 1-1 で示すように，合計で 29 の二次代謝物を合成する遺伝子クラスターを有することが予測されている [36]．

表 **1-1** ***S. coelicolor*** **において生産される二次代謝物**

Cluster location	Product
SCO0124-0129	Eicosapentaenoic acid
SCO0185-0191	Isorenieratene
SCO0267-0270	Lantibiotic
SCO0381-0401	Deoxysugar
SCO0489-0499	Coelichelin
SCO0753-0756	Bacteriocin
SCO1206-1208	THN, flaviolin
SCO1265-1273	Aromatic polyketide
SCO1864-1867	5-Hydroxyectoine
SCO2700-2701	Melanin
SCO2782-2785	Desferrioxamine
SCO3210-3249	CDA
SCO5071-5092	Actinorhodin
SCO5222-5223	Albaflavenone
SCO5314-5320	Gray spore pigmenent
SCO5799-5801	Siderophore
SCO5877-5898	Prodiginines
SCO6073	Geosmin
SCO6266	γ -butyrolactone SCB1
SCO6273-6288	Hexaketide
SCO6429-6438	Dipeptide
SCO6681-6685	Peptide SapB
SCO6759-6771	Hopene
SCO6826-6827	Polyketide
SCO6927-6932	Lantibiotic
SCO7221	Germicidin
SCO7669-7671	Aromatic polyketide
SCO7681-7691	Coelibactin
SCO7700-7701	2-Methylisoborneol

現在までに *S. coelicolor* における抗生物質制御機構の解明を目指した研究結果が既に多く蓄積されてきており [37]，特に Type Ⅱ の PKS (Poly-Ketide Synthase) によって生産されるアクチノロージンは *S. coelicolor* における抗生物質生産の制御機構解明のために使用されてきた経緯がある．つまり，図 1.2 で示すような手法を *S. coelicolor* に対して適用し，アクチノロージンの生産を抗生物質生産の一例として使用することで，*S.coelicolor* における抗生物質生産に関連する制御機構の研究が行われてきた [33]．その後，*S.coelicolor* において得られた知見の他菌株による他物質の生産への適用が拡大されてきた．

現在までの研究において，既に特定されている *S. coelicolor* における抗生物質生産の制御機構について以下に述べる．*S. coelicolor* における抗生物質制御機構は非常に複雑な形態を有しており，*S. coelicolor* によって生産されるアクチノロージン生産に関連する制御機構は大きく分けて三つに分類可能である (図 1-4).

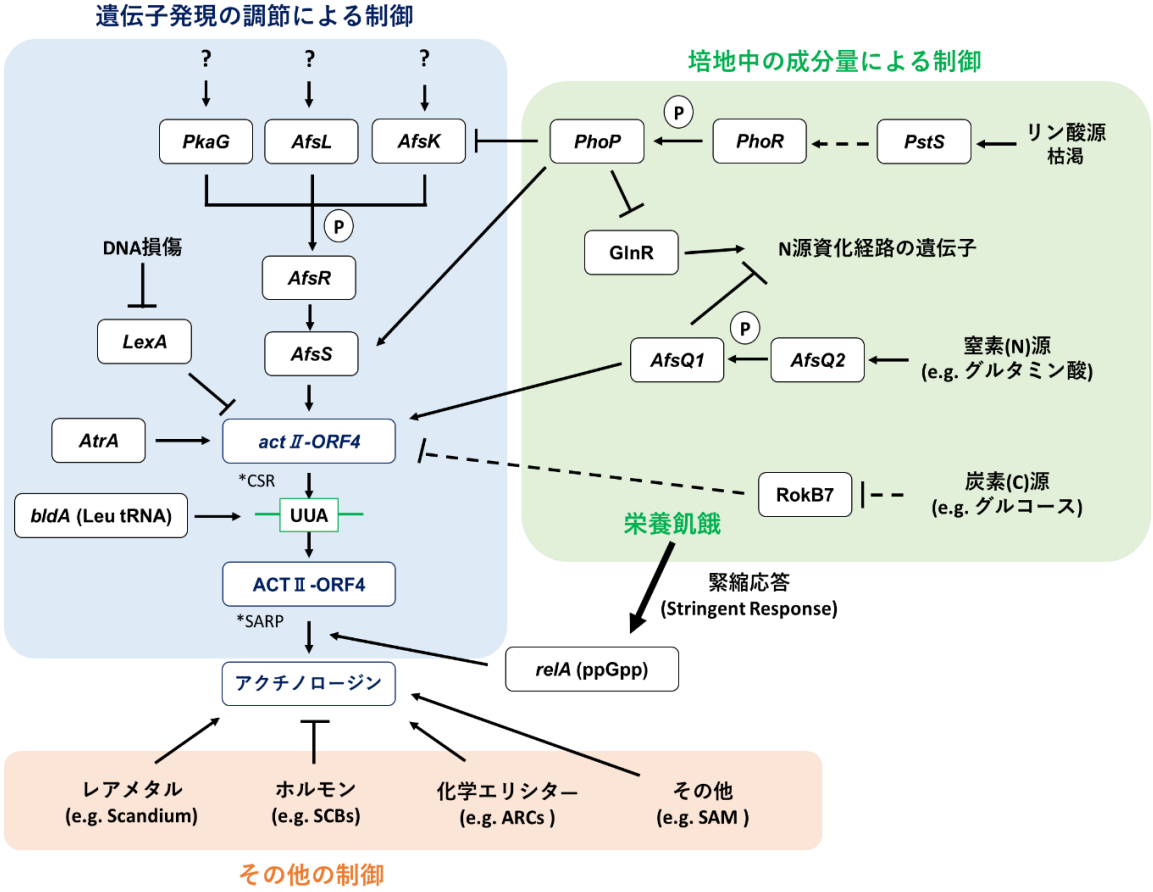


図 1-4 *S. coelicolor* におけるアクチノロージン生産に関連する制御機構図

以下にそれぞれについて詳細を述べる.

①：遺伝子発現による調節

アクチノロージンの生産は SARP (*Streptomyces* Antibiotic Regulatory Protein) の一種である ACTⅡ-ORF4 と呼ばれるタンパク質の合成によって開始され，ACTⅡ-ORF4 はアクチノロージン合成遺伝子クラスター中に存在する CSR (Cluster-Situated Regulator) の一種である *actⅡ-ORF4* 遺伝子によってコードされる [38]．本遺伝子の発現は更に上流の遺伝子群によって複雑に制御されており，中でも多面型制御因子である AfsK/AfsR を介した AfsS の活性化 [39] や GC 含有量の多い *Streptomyces* 属では出現頻度の低い UUA コドンを有する $tRNA^{Leu}$ をコードする *bldA* 遺伝子の発現が菌糸体合成 [40] やアクチノロージンの合成 [41] において重要であることが明らかになっている. 上記に加えて DNA 損傷によって発現される *lexA* [42] や，TetR-family 転写制御因子の１つである *atrA* [43] によっても *actⅡ-ORF4* の発現量は制御されている.

②：培地中の成分量による制御

抗生物質の合成には培地中の栄養分が枯渇することによって起きる緊縮応答が必要であると言われており，その際に *relA* 遺伝子の活性化によって ppGpp (Guanosine tetraphosphate) が合成され [44]，ppGpp が RNA ポリメラーゼの β サブユニットに結合することで抗生物質の生産が始まることが明らかになっている [45]．また，抗生物質の生産制御機構に関連する栄養源は主に窒素 (N) 源, 炭素 (C) 源, リン酸 (Pi) 源であり，それらの培地中の残存量によって，異なる制御遺伝子の活性が制御されている．窒素 (N) 源および炭素 (C) 源の枯渇はそれぞれ *afsQ1*/*AfsQ2* 遺伝子 [46] および *RokB7* 遺伝子 [47] の発現レベルを制御しており，それぞれが上述の CSR である *actⅡ-ORF4* の発現レベルを制御している．またリン酸 (Pi) 源の枯渇は PstS [48] によって感知され，二成分制御系である PhoR-PhoP の活性化を行った後，“①：遺伝子発現による制御”に位置する AfsK や AfsS の発現レベルを制御する．上記三種の栄養源の中でも特に，リン酸

(Pi) 源の枯渇が *Streptomyces* 属の一次代謝から抗生物質合成代謝への代謝変化に重大な影響を及ぼすことが明らかになっており，リン酸源が枯渇することによって上記で示した制御機構に従って菌体成長を促すための代謝が停止し，抗生物質を合成する遺伝子の発現が活性化されることが知られている [49].

また PhoR-PhoP は窒素 (N) 源の資化経路の遺伝子発現を制御することも知られている．このように，同じ制御系内および異なる制御系間において各制御機構が互いに影響を及ぼし合う“クロストーク (Cross talk)”が非常に複雑に形成されているため，*S.coelicolor* は抗生物質生産において非常に複雑な制御系を構成していると言われている [33].

③：その他の制御

アクチノロージンの生産は他の因子によっても制御されており，有名な因子がγ-ブチロラクトン骨格を有するオートレギュレーター物質の一種である SCBs (Streptomyces Coelicolor Butyrolactones)である．SCBs を合成する遺伝子 *scbA* および *scbB* はその破壊によってアクチノロージンの生産を向上させ，SCBs のレセプターをコードする遺伝子 *scbR* および *scbR2* を破壊することでアクチノロージンの生産が停止されることが明らかになっているが [50]，詳細な制御機構が未だ明らかにされていない.

また近年の研究では，Scandium などのレアメタルの添加によってアクチノロージンの生産量の増大が観測されている [51]．また ARC2 などの化学エリシターを添加することによって，アクチノロージンの生産量の増大が観測されている [52]．しかしながら，両研究においてその詳細な制御機構は明らかにされていない.

また，*S. coelicolor* は Actinorhodin (アクチノロージン) 以外に 3 つの抗生物質を主に産生する．具体的には，Undecylprodigiosin, Coelymicin P1, Calcium dependent antibiotics を産生し，それぞれの遺伝子クラスターが Actinorhodin における *act Ⅱ-ORF4* のように

CSR を有しており，上記の３つの抗生物質に対して，*redZ, cpkO, cdaR* が各抗生物質の生産を制御する代謝経路特異的制御遺伝子(CSR)である．興味深いことに，下記の図 1-5 に示すように，それぞれの CSR を強発現もしくは破壊されることで，他の CSR の発現量が影響され，他の抗生物質の生産量が制御されるクロストークが存在する [53].

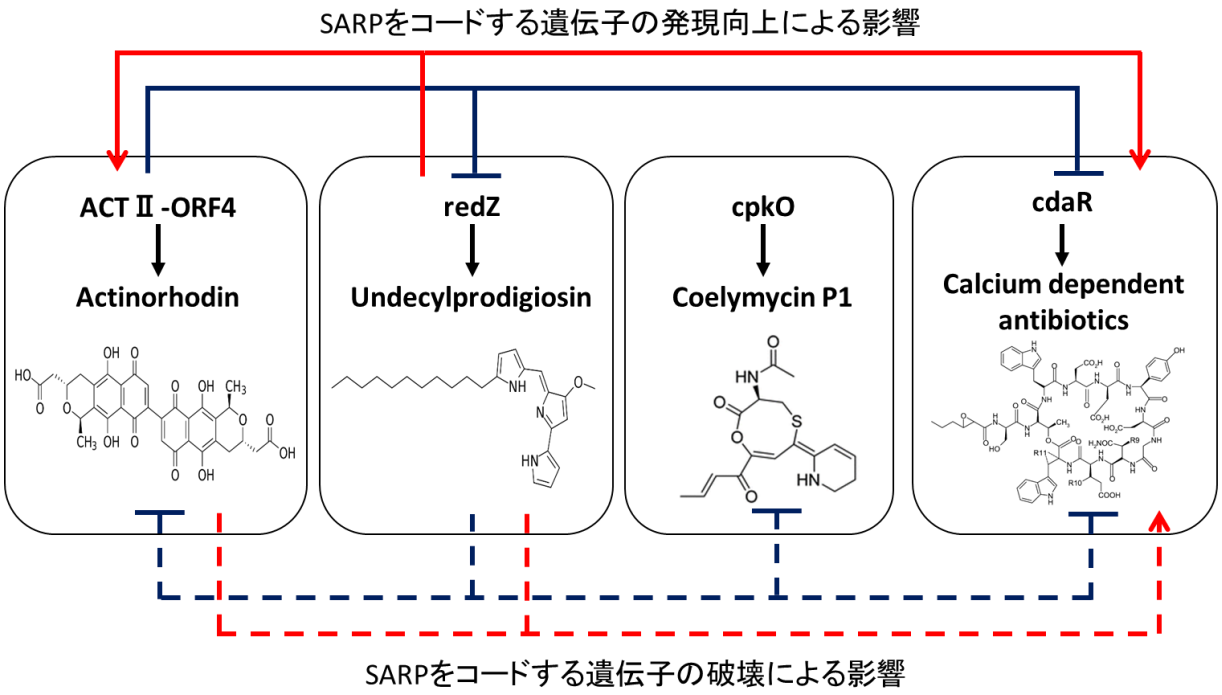


図 1-5 *S. coelicolor* の各 CSR 間のクロストーク概念図

本点からも *S.coelicolor* は抗生物質生産において複雑な制御機構を有していることが見て取れる．

上記の点から，各遺伝子クラスター間のクロストークによる制御機構を考慮から除外するため，それら４つの遺伝子クラスターを破壊した菌株を使用することが必要であると考えた．

1.4 オミクス解析

オミクス (omics) とは，ギリシャ語で「すべて・完全」を意味する接尾語 “-ome (オーム)” に「学問」を意味する接尾語 “-ics (イクス) ”を組み合わせた言葉であり，オミクスは対象物を「網羅的」に解析する学問のことを指す．オミクスの中でも，“ゲノミクス”，“トランスクリプトミクス”，“プロテオミクス”，“メタボロミクス”の ４種のオミクス解析が頻用されており，それぞれがゲノム (遺伝子)，トランスクリプトーム (一次転写物 : mRNA)，プロテオーム (タンパク質)，メタボローム (代謝物) の異なる階層の対象物を網羅的に測定する学問を指している (図 1-6).

生命は環境変化に対して，表現型の変化を最小化させるためのホメオスタシス (恒常性) を有しており，ある摂動に対する応答はトランスクリプトームからメタボロームへと下流へ向かうほど小さくなることが多い．そのため，メタボロームにはその摂動の影響が小さく表れる反面，その状況下でもメタボロームに表れる変化は摂動の影響を強く表すことが可能である [54]．また他の階層解析と比べてメタボロームは表現型と近いことから，精密表現型解析に使用することが可能である [55]． この二点からメタボローム解析は，生命現象を解明するための手法として非常に有効な手段である．

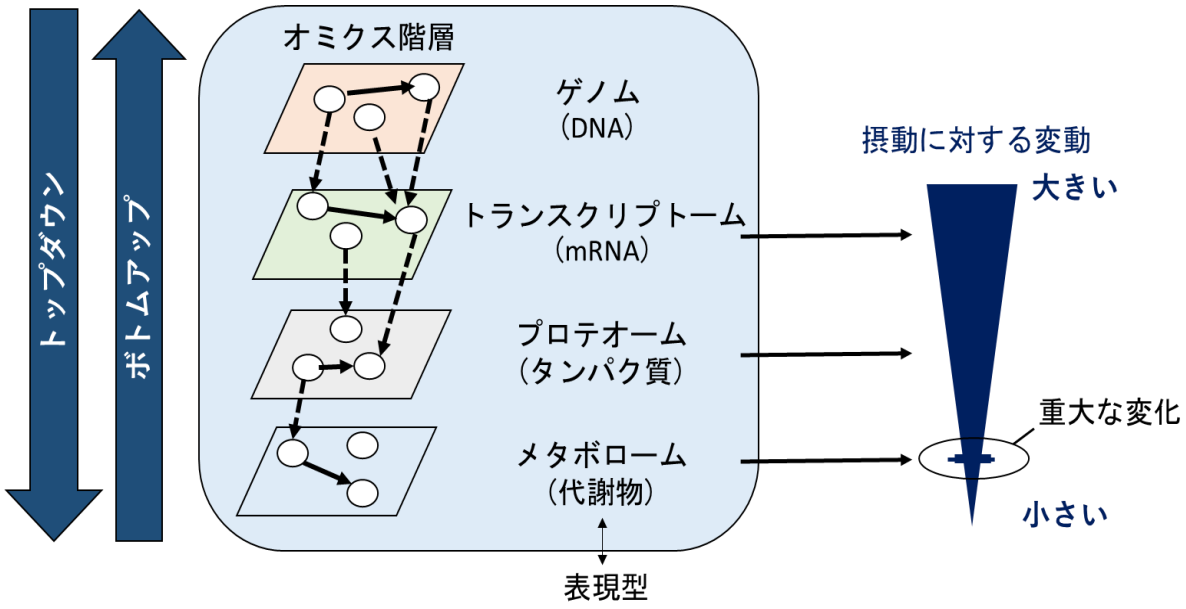


図 1-6　各種オミクス解析の概念図

しかしながら，オミクス解析の対象となる各オミクス階層は互いに複雑な関係性を有しており，当然のことながら独立しているわけではない．そのため各層のオミクス解析を複数用いるマルチ (統合) オミクス解析はより包括的で，より詳細な解析を可能にする手法であり，複雑な生命現象を紐解くための手法として注目を集めているとされている[56]．しかしながら，成果は捗々しくない．

現状ではマルチオミクス解析データに対して有効な解析手法を取った例は，代謝フラックス解析を含めたマルチオミクス解析結果をミカエリスメンテン式に対して統合した報告例や[57]，酵素論的代謝動態モデリングへのデータ統合を行った報告例[58]などの一部に留まっており，実際にはそのデータの多さおよび解析の煩雑さに起因し，多階層のオミクス解析データの有効な統合解析法は乏しく，多くの研究が Cytoscape などのオープンソースソフトウェアを用いた相関解析などに留まっている[59]．

そのため，有用なデータのマイニング (探索) を行うためには，一つのオミクス解析をメインの解析としながら，他層のオミクス解析データを補助データとして使う手法が一種の有効な手法であると提唱されている[59]．本手法は大きく分けて二分される．

①：トランスクリプトーム解析などの上流を出発点としたトップダウンのアプローチ

②：メタボローム解析を出発点としたボトムアップのアプローチ

上記二種の方法において各手法が利点と欠点を含んでいる．

手法①は分析可能対象範囲が非常に広く，より多くの情報を基に議論可能な一方，上流のオミクス解析結果で得られた変化が下流のプロテオームやメタボローム，ひいては表現型に必ずしも現れるわけではないといった欠点を含んでいる．またトランスクリプトーム情報は時間変動が大きく，よほど精緻に経時的サンプリングを実施し，変動量の微分を考慮に入れない限り，再現性のある定量的議論は極めて困難であり，曖昧な半定量的議論にとどまらざるを得ない．加えて情報が多いことに起因し，実験を複数回実施し，研究者の予断に適合する都合の良いデータだけを採用するといった傾向が顕著である．また，摂動に対する影響が大きいため，信頼度の高い発現変動遺伝

子を特定することが困難である．

手法②はメタボローム解析に基づいた精密表現型解析を行いながら，摂動に対する重大な変化を特定可能である一方，メタボローム解析は技術的問題に起因し，他のオミクス解析と比べて分析可能対象範囲が狭いことにより，中心代謝以外の代謝物を対象とする特定の条件下では議論を狭めてしまうといった欠点を有している．しかしながら，手法②ではメタボローム解析を用いることで摂動に対する重要な変化を特定することで，上流のプロテオーム解析ならびにトランスクリプトーム解析における多量情報の中から特定の注目すべきタンパク質群や遺伝子群に着目することが可能であるため，手法①で直面する問題を手法②は回避することが可能である．

1.5 *Streptomyces* 属へのオミクス解析適用における現状

Streptomyces 属のゲノムマイニングによって抗生物質合成遺伝子クラスターを推定可能だが，抗生物質生産の制御機構を解明することは不可能であることから，本問題点の解決のため，オミクス解析使用の重要性が提唱されてきた[60]．2002 年に全ゲノム配列が決定されて以来[35]，*S.coelicolor* の研究においてもオミクス解析が適用されるようになった．例えば抗生物質生産を担う二次代謝を誘導するメカニズムを解明するために，抗生物質を生産する前後での遺伝子発現[61]，mRNA の翻訳量[62]，タンパク質量[63]，タンパク質のリン酸化[64]，代謝物量[65]の変化を経時変化で分析した研究例や，抗生物質生産を制御する既知の各種制御機構の更なる理解のためにオミクス解析を適用した例[66]などが挙げられる．1.4 にてメタボローム解析およびメタボローム解析を基盤とするマルチオミクス解析の利点について述べたが，メタボローム解析の *Streptomyces* 属への適用例は他のオミクス解析の適用例と比べて非常に少ない．

近年では異なる階層の複数のオミクス解析を統合させる手法であるマルチオミクス解析に関しても，*Streptomyces* 属への適用例が報告されている．例を挙げると，既に代謝シミュレーションモデルによる多階層のオミクス情報の統合解析[67][68]や，異なる培養時期における試料のプロテオーム情報およびトランスクリプトーム情報の統合解析が報告されている[69]．しかしながら，適切なメタボローム解析結果を使用したマルチオミクス解析の適用例は未だ報告されておらず，代謝シミュレーションモデルへの適用例も報告されていない．

本問題点の原因は *Streptomyces* 属におけるメタボローム解析に供する試料の前処理法や代謝物の抽出法が最適化されていないことにあると問題提起されており，近年の研究では，菌体に付着する培地の洗浄液，菌体内代謝物の抽出液およびその抽出法を最適化した研究例[70]が報告されている．しかしながら，分析対象としている代謝物数の不足，培地洗浄液の菌体試料への残存などの問題点を考慮しておらず未だ不十分であると言える．数少ないメタボローム解析の *S. coelicolor* への適用例においても，試料の

菌体量で代謝物の濃度を正規化していないものや[71]，分析対象代謝物を事前に設定しないノンターゲットメタボローム解析において精密質量のみを用いた擬陽性の高い代謝物アノテーションを行っている報告例[72]が散見されるため，試料前処理に加えて，分析およびデータ解析においても問題点は残っていると推察された．本問題を解決するため，以下の表 1-2 に示す手法を用いることで上記問題の解決を試みた．本研究では試料前処理段階においては高速吸引ろ過器を使用することで培地洗浄後に菌体試料に残存している培地の洗浄液の除去を行い，分析においては事前に分析対象化合物を決定する LC-MS/MS を用いたターゲット分析を採用することで代謝物同定の擬陽性低減を図った．さらに菌体内の代謝物分析においては，代謝物分析値を代謝物の抽出に使用した菌体量で正規化することで，菌体量による代謝物量の誤差を補正した．

表 1-2　従来のメタボローム解析における問題点と本研究で用いられた手法

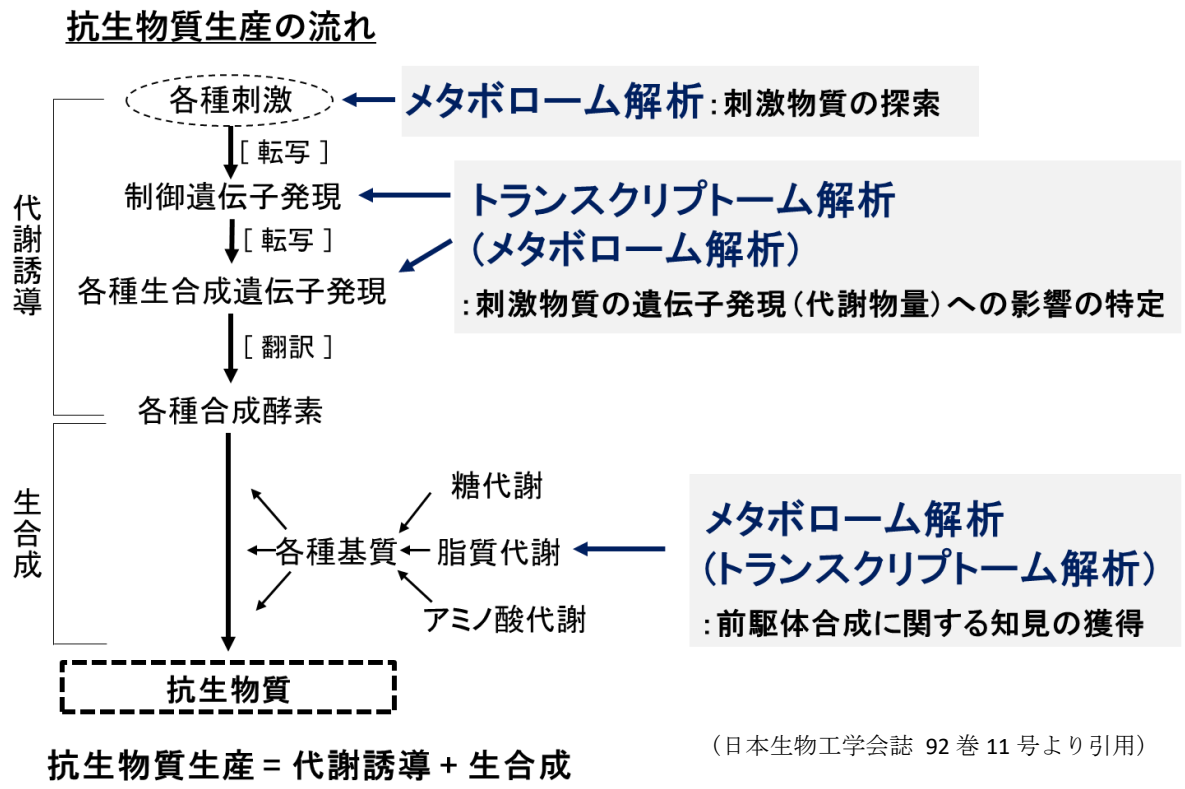
変更点	*S.coelicolor* の研究で頻用される手法		本研究で使用される手法
		欠点	
培地洗浄	塩化ナトリウム溶液	難揮発性であるため質量分析計による分析と適合しない	炭酸水素アンモニウム
培地洗浄液除去	遠心分離	培地洗浄液の完全な除去不可	吸引ろ過器の使用
培地抽出	50% メタノール	特になし	Bligh & Dyer法
代謝物アノテーション	検出ピークの精密質量	擬陽性の高さ	標準試料によって特定したRTおよびMRMの使用
データ正規化	なし	・人為的誤差，機器分析による誤差が補正されていない ・菌体量による差が補正されていない	・内部標準物質の使用 ・使用した菌体量による正規化

上記で示した試料の適切な前処理，得られた代謝物分析データの適切な解析を伴うメタボローム解析結果を取得することは過去の研究で考慮されてこなかった上記 (表 1-2) の問題点の解決が可能であり，*Streptomyces* 属のメタボローム解析分野ひいてはマルチオミクス解析分野において端緒を開くことが可能であると推察された．

1.6 本研究の目的，戦略および立ち位置

本博士論文研究では放線菌 *S. coelicolor* における抗生物質生産に関する制御機構解明に資する知見の獲得およびその作用機序の解明を目的とした．

放線菌における抗生物質生産の流れを下記の図 1-7 に示す．抗生物質生産は大きく分けて，代謝誘導および生合成の二つに分けることが可能である．ここで抗生物質生産代謝の誘導に寄与する各種刺激物質の探索ならびに前駆体合成に関する知見の獲得は代謝物を網羅的に分析することが可能であるメタボローム解析によって達成が可能であり，各種刺激による各種制御遺伝子の発現レベルの変化の特定は遺伝子発現を網羅的に分析するトランスクリプトーム解析によって達成可能であると期待される．しかしながら 1.4 で示したようにトランスクリプトーム解析は摂動に対する変動が大きいことに起因し，ありとあらゆる遺伝子が変動を示すことで真に摂動の影響に関連する遺伝子の特定が困難である．そこで摂動に対する変動が小さく，表現型の変化と密接なメタボローム解析によって重要発現変動遺伝子の更なる選抜が可能であると考えた．



（日本生物工学会誌 92 巻 11 号より引用）

図 1-7 抗生物質生産の流れ、およびオミクス解析適用における期待範囲

上記より本研究ではメタボローム解析による代謝物量情報を主データとしながら，トランスクリプトーム解析による遺伝子発現量情報を統合させたマルチオミクス解析を採用することで，本研究の目的をデータ駆動型の手法によって達成することを目指した (図 1-8)．その際，現状のメタボローム解析は分析可能範囲が狭いことに留意し，複数の代謝物分析プラットフォームを用いることで，分析可能範囲の拡大を試みた．

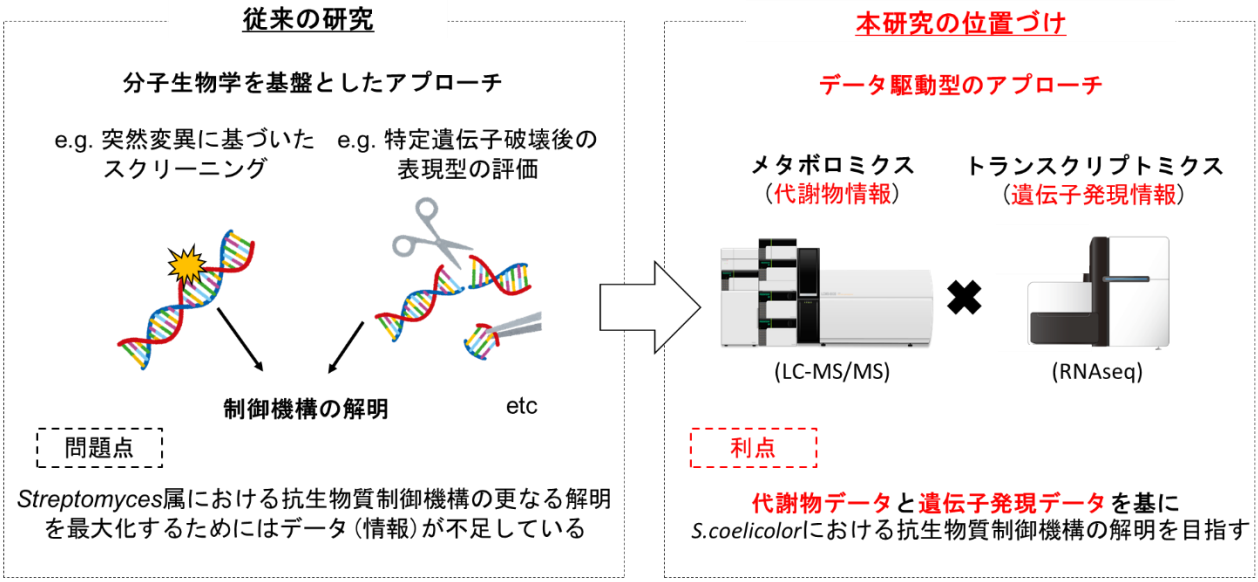


図 1-8 本研究における概念図

本研究では 1.3 で示したようにアクチノロージンがモデル抗生物質として機能し，アクチノロージンの生産研究で得られた知見が他の抗生物質へと拡大されていることから，放線菌 *S. coelicolor* が生産する色素系抗生物質アクチノロージン(Actinorhodin)の生産量を *S. coelicolor* における抗生物質生産能と定義した．本研究における流れを図 1-9 に示すが，第二章では *S. coelicolor* の異なる培養段階における *S. coelicolor* のオミクス解析ならびにアクチノロージン生産量の異なる *S. coelicolor* のオミクス解析を行うことで，抗生物質生産に重要な候補代謝物の特定を行った．その際，擬陽性確率の低い候補代謝物の特定のため，異なる抗生物質生産能を有する株の比較においては複数の実験条件の構築の構築が必要であると考え，ここでは図 1-2 で示した手法を用いることが有効であると考えた．その際，共培養は代謝物の由来の特定が困難であるこ

と，炭素源の変更などの培地組成の改変は菌体の成長速度に多大な影響を与えることからオミクス解析の適用例としてはふさわしくないと考えた．そのため本研究では生合成遺伝子導入ならびにリボソーム工学を用いて抗生物質生産能の異なる実験条件の構築を目指した.

第三章では候補代謝物を培養培地に添加した際の抗生物質生産量増加を確認することで，その代謝物の重要性の妥当性確認を行うと共に，該当代謝物を培養培地に添加した際のオミクス解析を行うことで,その作用機序を説明する仮説を提唱した.その後,仮説立証のための特定代謝経路の阻害剤を培養培地に添加することで本仮説の部分的な立証を行った.

第四章では第二章と第三章で得られた知見を基に総括と展望を述べた.

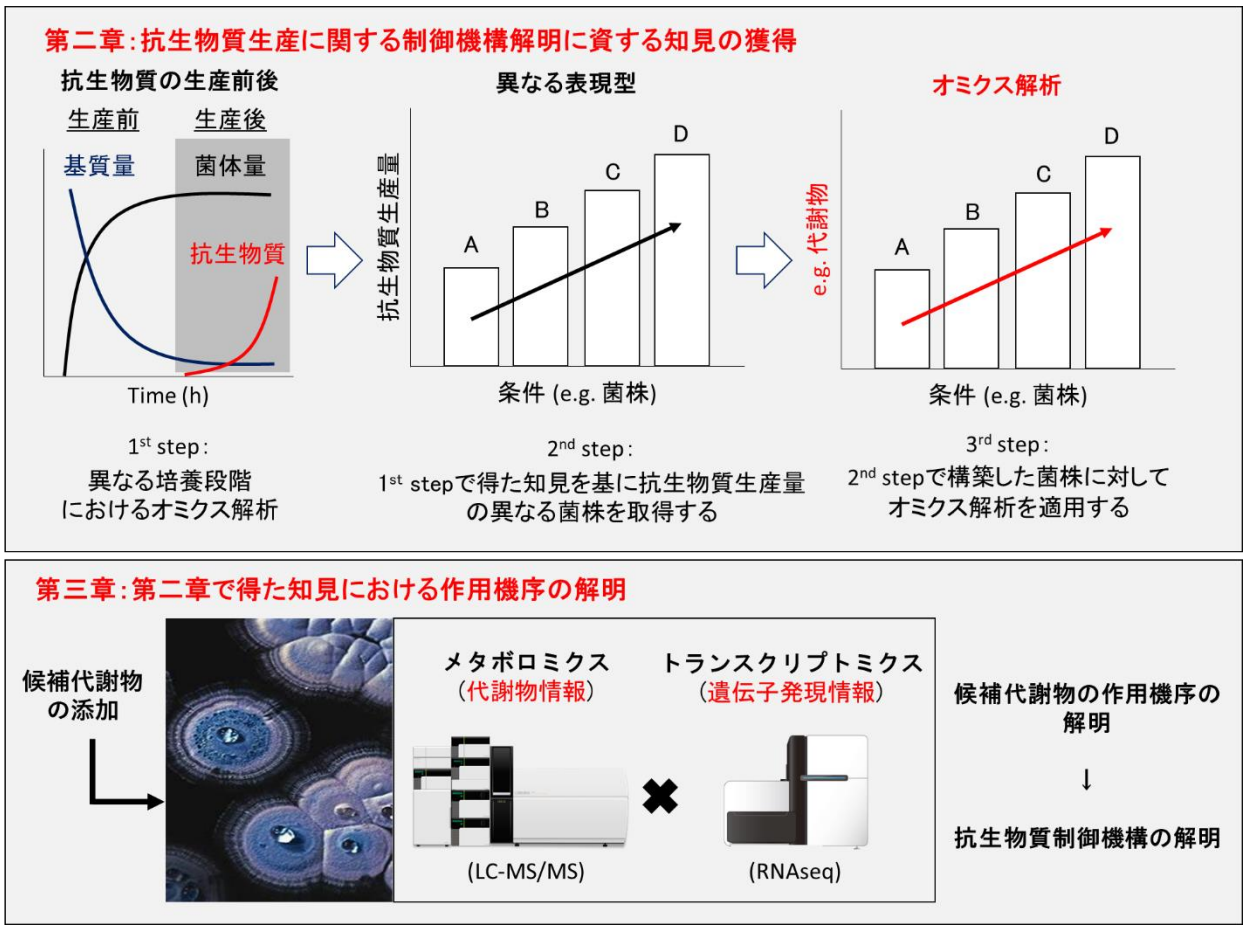


図 1-9 本研究における研究の流れ

第二章　抗生物質生成能の異なる放線菌 *Streptomyces coelicolor* のオミクス解析

2.1 緒言

オミクス解析を用いた表現型解析において重要なことは，研究目的を達成するために適した表現型の異なる試料を複数用意することである．これは，オミクス解析で得たデータを基に研究目的を達成するための仮説を提唱する際に，擬陽性を低減することで信頼性の高い仮説を提唱可能であるからである．

そこで本章では，*S. coelicolor* における抗生物質生産に関連する制御機構の解明を達成するため，抗生物質生産量の異なる複数の *S. coelicolor* のメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析を用いたオミクス解析を行うことで，抗生物質の生産に重要な代謝物 (もしくは遺伝子) の候補を特定することを目指した．

既述したように抗生物質の多くは，通常の培養条件下では生産されることなく，培地中の基質が消費された条件下でのみ生産される [26]．そのため，本研究では，抗生物質生産能の異なる菌株のオミクス解析による比較の前段階の検討として，*S. coelicolor* において培地中の基質が消費されたことで抗生物質を生産する時期および培地中の基質が十分量存在することに起因することで抗生物質を生産しない時期の両時期における代謝物絶対量および遺伝子発現量をそれぞれ測定し，*S. coelicolor* の異なる培養段階における代謝物レベルおよび遺伝子発現レベルでの重要な変化の同定を目指した．本結果から，抗生物質生産に関する知見を獲得することで，抗生物質生産能の異なる菌株の選抜のための知見の獲得を試みた．上記で得た知見を基に，抗生物質生産能の異なる複数の *S. coelicolor* の菌株の選抜を行い，それら菌株の６点の異なる培養段階における培養開始後の経時変化メタボローム解析をメインとし，経時変化トランスクリプトーム解析を補助データとした経時変化オミクス解析を行うことで *S. coelicolor* における抗生物質生産に重要な代謝物候補の特定を目指した．

2.2 実験材料および実験方法

2.2.1 LC-MS/MS に使用した試薬

下記に示す試薬は LC-MS/MS 分析において，各代謝物の RT の確認および定量のための検量線作成のために使用された．また各代謝物の略称は補助資料 図表 S1 に示す．G6P, S7P, R5P, F6P, G1P, Ru5P, DHAP, F1P, R1P, 6PGA, 3PGA, 2PGA, PEP, CoA, 3HB-CoA, Malonyl-CoA, Acetyl-CoA, Butyryl-CoA, Succinyl-CoA, Crotonyl-CoA, NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH, Nicotinate, Pantothenate, UDP-Glc, FAD, PRPP, CMP, UMP, GMP, IMP, TMP, AMP, cAMP, XMP, CDP, GDP, UDP, ADP, GTP, CTP, UTP, ATP，(+)-10-camphorsulfonic acid は Sigma-Aldrich (USA) から購入した．Glutamine, Threonine, Valine, Methionine, Tyrosine, Isoleucine, Leucine, Glutamate, Aspartate, Phenylalanine, Pyroglutamate, Tryptophan, Cystine, Serine, Asparagine, Glycine, Alanine, Citrulline, Histidine, Lysine, Arginine, 4-aminobutyrate, 2-aminobutyrate, SAM, SAH，Cytidine, Guanine, Hypoxanthine, Adenine, Xanthine, Uridine, Inosine, Orotatem Uracil, Cytosine, Thymine, Guanosine, Xanthosine, Adenosine, Thymidine, Urate, Glycolate, Succinate, Malate, 2OG, Pyruvate, Citrate, Iso-citrate, Isopropylmalate, Gluconate, Fumarate は富士フィルム和光純薬 (Japan) から購入した．

2.2.2 *Streptomyces coelicolor* の培養条件

本研究では，放線菌 *Streptomyces coelicolor* を最小栄養液体培地において培養し，菌体内および菌体外サンプルをオミクス解析に供した．そのため，液体培養を開始するにあたって，十分量の胞子を回収した．回収方法としては，SFM 固体培地に種菌を植菌した後に，プレート上のシングルコロニーを取得した．シングルコロニーを滅菌済みの MilliQ 水に混ぜ，本菌体液を再度多量の SFM 培地プレートに植菌した．植菌後 10 日前後に 20% グリセロールを染み込ませたコットンによって SFM プレート上の胞子を回収し，回収液の希釈系列 (10^6~10^8 希釈) を LB プレートにまくことで回収液中の胞子数を特定した．

特定した胞子数を基に，Sigmacote (Sigma-Aldrich, USA)で内面をコーティングした 250 mL フラスコ (通気向上のためステンレスバネを内在) 中の培養液 50 mL に対して，1 ×10^9 個の胞子を導入した時点を 0 時間として培養を開始した．培養は TAITEC 社の Bio Shaker BR-180LF を用いてインキュベーション温度 30°C，振盪速度 220 rpm で行った.

本章で使用した菌株を下記の表 2 にて示す.

表 2-1　本研究で使用された菌株

	菌株およびプラスミドの特性	参考文献
菌株		
M145	SCP1- SCP2- a derivative of *S.coelicolor* A3(2)	Kieser *et al*., 2000
M1146	M145 Δ*act* Δ*red* Δ*cpk* Δ*cda*	Gomez-Escribano *et al*., 2011
M1152	M1146 + *rpoB* 部分変異 [C1298T]	Gomez-Escribano *et al*., 2011
M145+ACT	M145 + pAH88	Gomez-Escribano *et al*., 2011
M1146+ACT	M1146 + pAH88	Gomez-Escribano *et al*., 2011
M1152+ACT	M1152 + pAH88	Gomez-Escribano *et al*., 2011
プラスミド		
pAH88	BAC derivative SCBAC28G1 containing Act genes cluster	Gomez-Escribano *et al*., 2011

また培養液組成は以下の通りである.

グルタミン酸添加最小栄養培地	
55.2 g/L グルタミン酸ナトリウム	420 mL
50% (v/v) グルコース	40 mL
100 mM $MgSO_4$	10 mL
50mM リン酸バッファー (pH 7.2)	23 mL
*Tace elements	4 mL
**TMS1 trace elements	2.8 mL
Antifoam 289 (Sigma A5551)	0.5 mL
2M 水酸化ナトリウム	0.5 mL
	500 mL

*Trace elements	
$ZnSO_4・7H_2O$	0.1 g
$FeSO_4・7H_2O$	0.1 g
$MnCl_2・4H_2O$	0.1 g
$CaCl_2・4H_2O$	0.1 g
水酸化ナトリウム	0.1 g
	1L

**TMS1 trace elements	
$ZnSO_4・7H_2O$	440 mg
$FeSO_4・7H_2O$	5 g
$MnSO_4・4H_2O$	150 mg
$CuSO_4・5H_2O$	390 mg
$Na_2MoO_4・2H_2O$	10 mg
$CoCl_2・6H_2O$	20 mg
HCl	50 ml
	1L

2.2.3 菌体および培養液サンプルの回収

菌体の成長曲線作成のため，培養液を 2 mL 回収し，遠心分離 (10000 rpm, 10 分, 4°C) によって培養液を菌体と培地に分離した．培地上澄みを除去した後に，菌体に対して MilliQ 水を加えボルテックスすることで菌体を洗浄した．洗浄後の菌体を遠心分離 (10000 rpm, 10 分, 4°C) によって洗浄液と菌体に分離し，洗浄後の菌体を凍結乾燥にかけた後に，菌体重量を測定することで乾燥菌体重量を測定した．本乾燥菌体重量を基に各 *S.coelicolor* の菌体増殖曲線を作成した．メタボローム解析，抗生物質生産量定量および培地基質定量のための菌体および培養液は以下に示す流れで回収した．

培養液は，上記と同様に，培養液を 1 mL 回収し，遠心分離 (10000 rpm, 10 分, 4°C) によって培養液を菌体と培地に分離し，培地上澄みを回収し，抗生物質定量，培地基質定量および細胞外メタボローム解析のための前処理に供するまで-80°C で保存した．

菌体試料は，菌体を含む培養液を凡そ 10 mg の菌体量が回収できるように回収し，PTFE メンブレンフィルター (5.0 μm 孔径) および高速吸引ろ過器を用いることで，フィルター上に菌体を回収し，培地と分離を行った．フィルター上の菌体に対して，回収した培養液量の二倍量の炭酸水素アンモニウム液 (3.5%, w/v) を加えることで菌体に付着する培地成分を洗浄し，洗浄後の菌体をフィルターと共に 15 mL ファルコンチューブに入れた後に，液体窒素を用いて菌体内の代謝の停止 (クエンチング) を行い，前処理に供するまで -80°C で保存した．

2.2.4 アクチノロージンの定量

培地中のアクチノロージンの定量は過去の文献 [61] に従い行った．培地 500 μL に対して 1M 水酸化ナトリウムを等量加えた後に、吸光光度計を用いて波長 608 nm における吸光度を測定した．その後，吸光度 (608 nm) : 1 = 120 mg/L の式に従い培養液中のアクチノロージンの定量を行った．細胞内アクチノロージン定量は 2.2.6 に示す手法によって得た抽出液 500 μL に等量の 1M 水酸化ナトリウムを加えた後に，吸光光度計を用いて波長 608 nm における吸光度を測定した．定量のため，濃度既知の培養液を

同様の抽出法で抽出を行い，本抽出液 500 µL に対して，同様に水酸化ナトリウムを加えた際の吸光度 (608 nm) を定量のための基準値として用いることで細胞内アクチノロージンの定量を行った．その際に乾燥菌体重量によって定量値を補正した．

2.2.5 培地成分の定量

培地中成分であるグルコース, グルタミン酸, リン酸はそれぞれ F-kit-D-glucose (Roche), L-グルタミン酸測定キット ヤマサ NEO (ヤマサ), Pi-Blue Phosphate assay kit (Bioassay Systems) によって定量した．

2.2.6 メタボローム解析に向けた回収試料の前処理

細胞外メタボローム解析のための試料前処理は以下の手法によって行った. 50 µg/L の (+)10-camphorsulfonic acid を含む抽出液 Mix-solvent 1.8 mL (メタノール：超純水：クロロホルム ＝5：2：2, (v/v/v))に対して，培地上澄み 50 µL を加え，ボルテックスした後に，-30°C で 30 分間保存した．本抽出液 1.35 mL に対して，650 µL の超純水を加えてボルテックス後に，遠心分離 (10000 rpm, 10 分, 4°C) によって二層分離を行い，水層を 0.2 µm PTFE フィルターによってろ過を行った．ろ過後の抽出液 1 mL を遠心濃縮によって抽出液中のメタノールを除去し，終夜凍結乾燥を行った．分析まで凍結乾燥後のサンプルは分析まで-80°C で保存した．分析の際は 200 µL の超純水に溶解した後に試料を分析に供した．

また細胞内メタボローム解析のための試料前処理は以下の手法によって行った．

菌体を含むフィルターが入った 15 mL ファルコンチューブに対して，50 µg/L の(+)10-camphorsulfonic acid を含む抽出液 Mix-solvent 4.0 mL (メタノール：超純水：クロロホルム ＝5 : 2 : 2, (v/v/v))を加えた後に, 以下に示す凍結融解抽出サイクルを３回行った．

①：-80°C において，抽出液を凍結する．

②：-30°C において，抽出液を融解する．

③：抽出液をボルテックス後，10 秒間ソニケーションを行う．

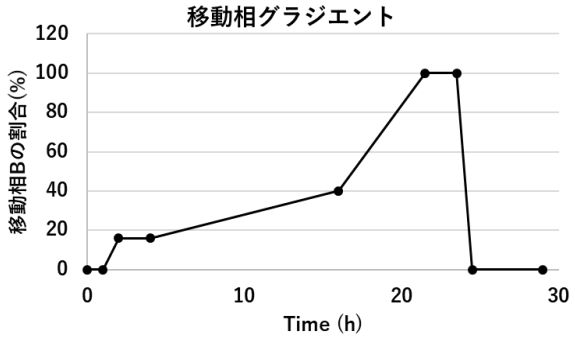
その後，抽出液を遠心分離 (10000 rpm, 10 分, 4°C) にかけることで，菌体と抽出液に分離し，抽出上澄み液を細胞内メタボローム解析に，菌体を代謝物量データ補正のための乾燥菌体重量測定に供した．抽出液は 2 mL 回収し，回収した 2 mL 抽出液に対して 1 mL の超純水を加えてボルテックスした後に，遠心分離 (10000 rpm, 10 分, 4°C) によって二層分離を行った．水層 2 mL を遠心濃縮に供した後，凍結乾燥を行った．凍結乾燥後のサンプルは分析まで-80°C で保存した．分析の際は 400 µL の超純水に溶解した後に試料を分析に供した．代謝物抽出後の菌体は超純水で洗浄した後に，洗浄液を除去した後，凍結乾燥によって水分を除去した．本サンプルの重量 (乾燥菌体重量+フィルターの重量) および前もって測定したフィルターの重量から，細胞内メタボローム解析に供するために回収した菌体の乾燥菌体重量を算出した．

2.2.7 LC-QqQ MS による一次代謝物の相対定量，そのデータ解析および統計解析

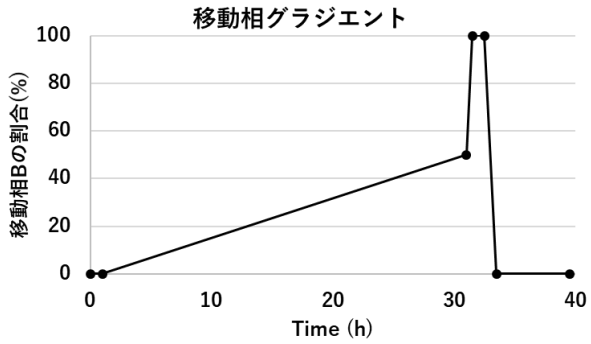
一次代謝物の分析のため，本研究では LC-QqQMS による LC-MS/MS 法を用いた．使用した分析系は大きく分けて，イオンペア試薬による逆相クロマトグラフィーを用いた系および PFPP カラムによる逆相クロマトグラフィーを用いた系の二つの系である．イオンペア試薬として TBA (トリブチルアミン) を用いた系では，TBA がポジティブイオンとしての特性を有していることに起因し，質量分析計でのイオン化モードはネガティブイオン化モードに限られる．そのため，ポジティブイオン化モードでイオン化しやすい一部のアミノ酸や核酸塩基は TBA を用いた逆相イオンペアクロマトグラフィーを用いた系では検出が困難である．そのため，それらの代謝物は PFPP カラムを用いた逆相クロマトグラフィーを用いた系において，ポジティブイオン化モードでイオン化を行うことで分析を行った．各分析手法の詳細は以下の通りである．

クロマトグラフィー条件

LC ポンプシステム：Nexera X2 UHPLC (Shimadzu)
カラム：L-column 2 (2.1×150 mm, 3 μm, CERI)
移動相：A 15 mM TBA, 10 mM 酢酸添加超純水，B メタノール
カラムオーブン温度：45°C
移動相グラジエント：下記に示す通り.



*ただし，糖リン酸の異性体分離のためには，下記のグラジエントを採用した.



質量分析計条件

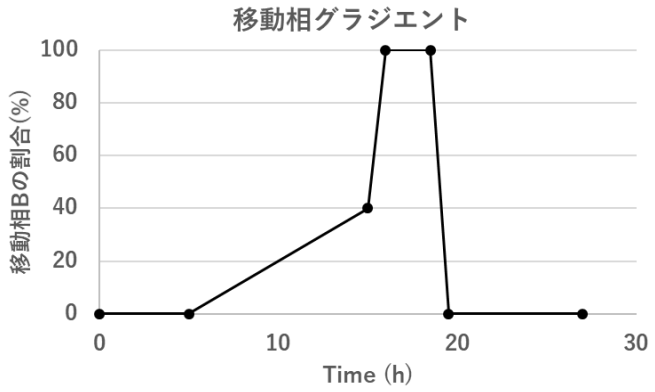
質量分析機：LCMS8050 (Shimadzu)
分析モード：MRM
MRM トランシジョン: 補足資料 (図表 S2)を参照 *糖リン酸分析の MRM は補足資料 (図表 S3) を参照
イオン化モード：ネガティブイオン化モード
イオン化法：ESI
DL 温度：250°C
インターフェース温度：400°C
ヒートブロック温度：400°C
ネブライザーガス流速：3 L/min
ドライイングガス流速：10 L/min
ヒーティングガス流速：10 L/min

PFPP カラムによる逆相クロマトグラフィー系

クロマトグラフィー条件

LC ポンプシステム：Nexera X2 UHPLC (Shimadzu)
カラム：Discovery HS F5 (2.1×150 mm, 3 µm, Sigma)
移動相：A 0.1% (v/v) ギ酸添加超純水，B アセトニトリル
カラムオーブン温度：40°C

移動相グラジエント下記に示す通り



質量分析計条件

質量分析計：LCMS8050 (Shimadzu)

分析モード：MRM
MRM トランシジョン：補足資料 (図表 S4) を参照
イオン化モード：ネガティブイオン化モード
イオン化法：ESI
DL 温度：250°C
インターフェース温度：400°C
ヒートブロック温度：400°C
ネブライザーガス流速：3 L/min
ドライイングガス流速：10 L/min
ヒーティングガス流速：10 L/min

各代謝物の略称は補足資料 図表 S1 に記載する．全ての代謝物分析データは Lab solution (Shimadzu)によって，各代謝物のピークエリア値を算出し，内部標準物質であ

る(+)-10-camphorsulfonic acid のピークエリア値で補正したものを相対定量値とした．

データ解析で使用したヒートマップ解析は R パッケージ pheatmap によって R ver. 3.6.1 上で行った．

2.2.8 U-^{13}C 標識体の抽出

2.2.9 で使用する絶対定量の際のマトリックス効果除去のための U-^{13}C 標識体は以下の手法によって得た．20 mg の Algal cells U-^{13}C (クロレラ乾燥品，SI サイエンス社) に対して 20 mL の Mix-solvent (メタノール：水：クロロホルム ＝ 5：2：2, v/v/v) を加え，ボルテックスした後に下記に示す凍結融解サイクルを 3 サイクル行った．

① -80°C にて凍結を行う．

② -30°C にて融解を行う．

③ ボルテックスした後に，10 秒間ソニケーションを行う．

その後，遠心分離を行い (10000 rpm, 10 分, 4°C)，上澄み 20 mL に対して，超純水 10 mL を加えた後にボルテックスを行い，遠心分離 (1000 rpm, 10 分, 4°C) によって二層分離を行った．水層を可能な限り採取し，遠心濃縮によってメタノールを除去した後に，凍結乾燥を行った．凍結乾燥後のサンプルは内部標準物質として使用するまで，-80°C で保存した．

2.2.9 LC-QqQ MS による一次代謝物の絶対定量，データ解析，代謝物添加回収試験

代謝物の絶対定量には，(+)-10-caphorsulfonic acid の代わりに 2.2.8 で得た各代謝物の U-^{13}C 標識代謝物を内部標準物質として用いた．LC-MS/MS による分析においては 2.2.7 に示した手法と同様の手法で分析を行った．ただし，各代謝物の MRM は 2.2.7 と異なり， U-^{12}C 標識の MRM および U-^{13}C 標識の MRM を採用した．RT や MRM などの各分析法における分析情報は下記の通り記載する．

イオンペア試薬による逆相クロマトグラフィーを用いた系：補足資料 図表 S5, S6

PFPP カラムによる逆相クロマトグラフィーを用いた系：補助資料　図表 S7

全ての代謝物分析データは Lab solution (Shimadzu) によって解析を行った．標準品混合液および試料抽出液由来の各代謝物のピークエリア値から，U-^{12}C 標識ピークエリア値/U-^{13}C 標識ピークエリア値を算出した. 標準品混合液中の既知濃度を説明変数に，標準品混合液分析時の U-^{12}C 標識ピークエリア値/U-^{13}C 標識ピークエリア値を応答変数とした直線回帰式を作成し, R^2 値が 0.99 以上および三反復データから算出した RSD 値が 5%以下になる範囲を有効な直線範囲とし，本式を絶対定量のための検量線として使用した．本検量線とサンプル抽出液由来の各代謝物の U-^{12}C 標識ピークエリア値/U-^{13}C 標識ピークエリア値から，実濃度の算出を行った．また，代謝物の回収率を以下の手法および計算式を用いた添加回収試験によって算出し，マトリックス効果の除去および代謝物の回収率の観点からのバリデーションを行った.

以下に添加回収試験の詳細を記す.

まず初めに，試料 (菌体もしくは培地)，試料に標準品を添加したもの，ブランク試料を用意した．その後，試料 (菌体もしくは培地)，試料に標準品を添加したものに対しては，内部標準物質を添加した抽出液を，またブランク試料には内部標準物質を添加していないものを添加し，上記の抽出法と同様に凍結融解および二層分離を行った．試料 (菌体もしくは培地)，試料に標準品を添加したものに関しては，二層分離後の上澄み液をそのまま遠心濃縮および凍結乾燥に試料を供し，ブランク試料に関しては，

二層分離した上澄み液に対して，上記で添加した標準液の量と内部標準物質の量の比が同等になるように添加した後に遠心濃縮および凍結乾燥に試料を供した．その後，LC-MS/MS 分析で得られた応答値と基にそれぞれの試料で U-^{12}C/U-^{13}C 比を算出し，下記の式より回収率を算出した．

$$\frac{\text{標準物質を添加した際の U-}^{12}\text{C/U-}^{13}\text{C 比率} - \text{標準物質を添加していない際の U-}^{12}\text{C/U-}^{13}\text{C 比率}}{\text{添加した標準品の U-}^{12}\text{C/U-}^{13}\text{C 比率}}$$

2.2.10　RNA 抽出・精製および品質確認

RNA 抽出および精製に用いるチップ，チューブは RNAase のコンタミネーションを防ぐために，120°C，20 分の条件下で 2 回オートクレーブによる不活化操作を行った．RNA 抽出のためのサンプルは乾燥菌体重量で凡そ 2 mg 以上になるように回収した．その際，回収培養液量の二倍量の RNA protect reagent (Qiagen, Germany) を予め入れておいた 15 mL ファルコンチューブで回収を行った．ファルコンチューブに回収後，五秒間ボルテックスを行い, 遠心分離 (5000×g, 10 分，室温)で菌体と RNA protect reagent 培地混合液に分離した．その後，RNA protect reagent 培地混合液を可能な限り，取り除いた後に，菌体入りのファルコンチューブを-80°C で RNA 抽出まで保存した．

RNA 抽出・精製の手順は以下に示す通りである.

○菌の溶解

①：超純水に溶解したリゾチーム (15 mg/mL) のうち 0.17 mL を凍結菌体に加える.

②：30°C で 10 分間インキュベートする.

③：菌の溶解物を β-メルカプトエタノールを加えた(100：1, v/v) RLT バッファー (Qiagen 社) 0.6 mL を入れた Lysing Matrix B (MPBio, USA) に対して加える.

④：ボルテックスにてよく混合する.

⑤：FastPrep (MPBio, USA) にて，6.5 m/s, 30 秒の条件で 3 回振盪を行い，菌の溶解を行った．ただし，各回の振盪ごとに氷上で 30 秒間保冷を行った.

⑥：遠心分離 (10000 rpm, 1 分，4°C) で破砕用のビーズと溶解液を分離した.

○RNA 抽出

①：0.65 mL の菌体溶解液を PLG (Phase Lock Gel) tube に移した.

②：0.65 mL の CIA 溶液 (Chloroform : Isoamyl alcohol: Acid phenol) 液を菌体溶解液に加えた.

③：1 分間よく混合した後に遠心分離 (10000 rpm，5 分，4°C) を行い，0.6 mL の上澄みを回収した.

○RNA の精製

RNA の精製には市販の Direct-zol MiniPrep Plus kit (Zymo research, USA) を使用した.

①：0.6 mL の RNA 抽出液に対して，等量の 95%エタノールを加えた.

②: 0.6 mL の RNA 抽出液・エタノール混合液をカラムコレクションチューブに移し，10000 rpm で 30 秒間遠心することで RNA をカラム上に回収した.

③：残りの 0.6 mL の RNA 抽出液・エタノール混合液を再度，同一のカラムコレクシ

ョンチューブに移し、10000 rpm で 30 秒間遠心することでさらに RNA をカラム上に回収した.

④ : RNA を回収したカラムを新たなチューブに移し替えた後に，400 µl の RNA wash buffer を加え，10000 rpm で 30 秒間遠心した.

⑤ : 洗浄したカラムに対して，5 µl の DNase I (6 U/µl) と 75 µl の DNA digestion buffer を加えた後に，30°C で 15 分間インキュベートした.

⑥ : 400 µl の Direct-zol RNA PreWash buffer で 2 回，700 µl の RNA wash buffer で 1 回カラムを洗浄した.

⑦ : カラムを RNase フリーの新しいチューブに移した後に，カラムに対して 50 µl の DNase/RNase-Free Water を加え，遠心分離 (10000 rpm，1 分，4°C) により RNA を回収した.

⑧ : 回収した RNA の一部を Nano drop による RNA 定量および Bioanalyzer による品質評価に供した. 残りを RNAseq 解析のため, アウトソーシング先への輸送まで-80°C で保存した.

2.2.11 rRNA 除去，cDNA ライブラリーの作成およびシークエンシング(RNAseq)

精製した RNA サンプルからの rRNA の除去, cDNA ライブラリーの作成およびそのシークエンシングは全て Vertis 社 (Germany) に委託した. cDNA ライブラリーは Illumina 社の NextSeq 5000 System によって，75 bp 長で，総リード数 1×10M になるようにシングルエンドシークエンシングが行われた.

2.2.12 RNAseq 生データのマッピング処理およびリードカウント

シークエンシング後のデータの解析は，マンチェスター大学の Linux サーバー上で行った．マンチェスター大学の Linux サーバーには Windows 上で Virtual Box を用いて構築した仮想 Linux OS からスクリプトシェル (Script Shell) 接続によって接続した．

S. coelocolor のリファレンスゲノムは NCBI データベースから取得した．RNAseq から得られたリードをマッピングするためのリファレンスゲノムライブラリーの作成およびリードのマッピング作業は STAR ver. 2.7 [73] を用いて行った．得られた SAM ファイルは Samtools [74] を用いて BAM ファイルへと変換した．リファレンス遺伝子モデルの作成，リードカウント，正規化および遺伝子発現変動解析は下記に示すような手順で行った．全ての BAM ファイルは R ver.3.6.1 上に移され，BAM ファイルリスト作成は R パッケージ Rsamtools によって，リファレンス遺伝子モデル構築は R パッケージ GenomicFeatures [75] によって，リードカウントは R パッケージ GenomicAlignments [75] によって，また RLE 正規化および遺伝子発現変動解析は R パッケージ DESeq2 [76] によって行った．遺伝子発現変動解析における DEG の特定には FDR が 5%以下かつ Log_2FC が 0.5 以上を基準として設定した．折れ線図におけるリードカウント量の比較には TPM 正規化 (①: 遺伝子長が 1000 bp, ②: 総リード数が 100 万リードになるようにする正規化)を用いた．

2.2.13 RNAseq データの統計解析

k-means クラスタリングは iDEP90 [77] を用いて行った．データ解析で使用したヒートマップ解析は R パッケージ pheatmap によって R ver. 3.6.1 上で行った．GSEA 解析は DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis [78] [79] によって行った．

2.3 結果と考察

2.3.1 *Streptomyces coelicolor* M1146 株の表現型

Streptomyces coelicolor M1146 株は，野生株 M145 株における主要な抗生物質合成遺伝子クラスターである *act, red, cpk, cda* 遺伝子クラスターを破壊した菌株であり [80]，*S. coelicolor* における異種由来の抗生物質生産に頻用される株である [81]．また，それぞれの遺伝子クラスターを破壊しているため，それぞれ４つの抗生物質合成遺伝子クラスター間のクロストークを有していないことから抗生物質生産に関連する制御機構の解明に使用する株として優位性を有する．本菌株において，炭素流束の理解のため代謝フラックス解析が既に適用されているが [82], 未だメタボローム解析の適用例はない．メタボローム解析は各サンプリングポイントにおける代謝物量のスナップショット解析に過ぎないため，代謝フラックス解析のように炭素流束に関する情報の獲得は困難であるが，代謝フラックス解析と比較して，より広い代謝範囲での議論が可能であることから，抗生物質生産に資する代謝物の特定に有用である．また代謝物の絶対定量によって，各代謝物の濃度を算出することが可能である．また本株は上記に示した通り，四つの主要な抗生物質合成遺伝子クラスターを破壊していることから，オミクス解析を用いた抗生物質生産量の多い株との比較の際に，本株を抗生物質生産量の少ない基準株として使用することが可能である．緒言で述べたように，*S. coelicolor* では，培地中の栄養源の量によって，菌体成長ならびに抗生物質生産が支配されており，多くの抗生物質は培地中の栄養源が枯渇した培養定常期に緊縮応答によって生産される．そのため異なる抗生物質生産能を有する菌株の解析に先んじて，基準株における異なる菌体増殖段階における主要な変化の特定は，異なる抗生物質生産能を有する菌株の選抜に有用であると考えた．そこでまず初めに M1146 株の培養開始後の経時変化における菌体量の変化および培地中の残存基質濃度を測定した．M1146 株の菌体増殖曲線および培地成分量曲線を下記の図 2-1 に示す．

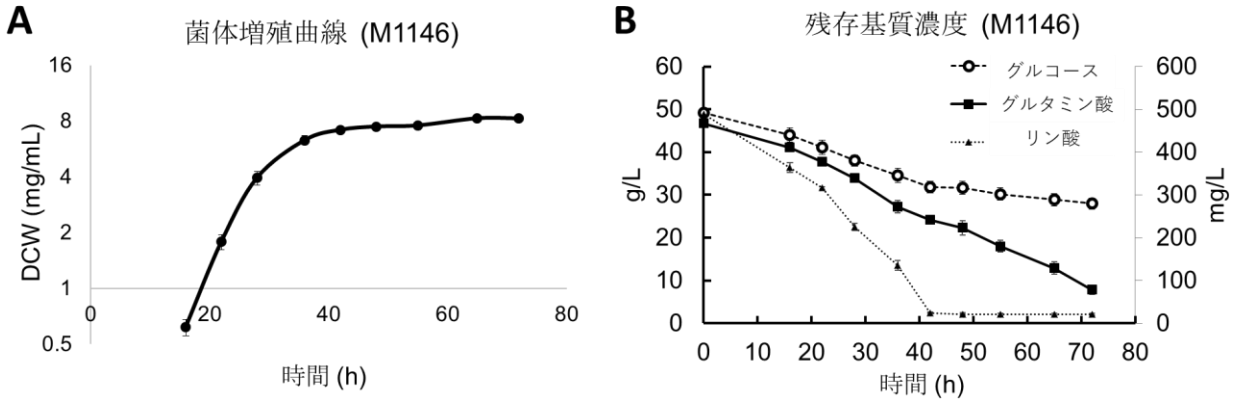


図 2-1 M1146 株の表現型 (菌体量および基質消費量)

(A) M1146 株の DCW (乾燥菌体重量) に基づいた菌体増殖曲線を示す (N=3).
(B) M1146 株の残存基質濃度. グルコース, グルタミン酸, リン酸の消費量を示す (N=3).

上記の図 2-1 から示されるように，培地中のリン酸が枯渇した際に，菌体の増殖が停止していることがわかる. これは *S. coelicolor* は二成分制御系の一つである PhoR-PhoP によって菌体増殖および抗生物質生産が制御されているためである [49]．つまり，リン酸が残存している増殖段階では基質が細胞増殖に使用され，リン酸が枯渇した増殖段階では抗生物質の生産が開始される．また，最終サンプリング時の 72h ではリン酸に加えて，窒素源であるグルタミン酸も同様に枯渇していることがわかる．また，同様の培養条件下で M1146 株を培養した過去の研究では, 40h 前後において TypeⅢの PKS によって合成される抗生物質 Germicidin の産生開始が観測されており [67]，本研究におけるリン酸の欠乏時期と適応した結果となっている．そこで，培地中の基質が十分に残存している対数増殖期 (20h) および培地中の基質が枯渇している定常期 (72h) は *Streptomyces* 属の菌体成長段階における表現型の主要な変化を説明する代表的な増殖期であると考えられ，それらの二点の培養段階における細胞内・細胞外の代謝物の量変化を特定することで，それら二点における主要な代謝物変化の特定を目指した．その際, 相対定量値では各代謝物の濃度比較を行うことが不可能であることを考慮して, 代謝物同士の量比較を可能にする絶対定量によって, 本目的を達成することを試みた.

2.3.2 *Streptomyces coelicolor* M1146 株の一次代謝物絶対定量

質量分析計を用いた代謝物絶対定量には，重大な欠点があり，代謝物をイオン化する際に，他の夾雑物と同時にイオン化されることで，目的の代謝物のイオン化が抑制されるもしくは増強されるマトリックス効果を受ける点である [83]．こうしたマトリックス効果を除去するための有効的な手法として，試料からの代謝物抽出時に目的代謝物の安定同位体異性体を内部標準物質として添加する方法である．本方法では安定同位体異性体が一定の条件下では，クロマトグラフィーにおいて同様の保持時間を示すこと，定量目的物質と同様のマトリックス効果を受けることを利用した方法 [84,85] である．本手法を用いることで *S. coelicolor* M1146 株の培養開始 20 時間後 (対数増殖期) および 72 時間後 (増殖定常期) の試料から 100 種の細胞内代謝物および 52 種の細胞外代謝物を定量することに成功した．*S. coelicolor* において，一次代謝物の網羅的な絶対定量を行った研究は未だ報告が無く，本研究が初の研究となった．以下に，各培養時間での主要な代謝物の変化を円グラフ (図 2-2) にて示す．

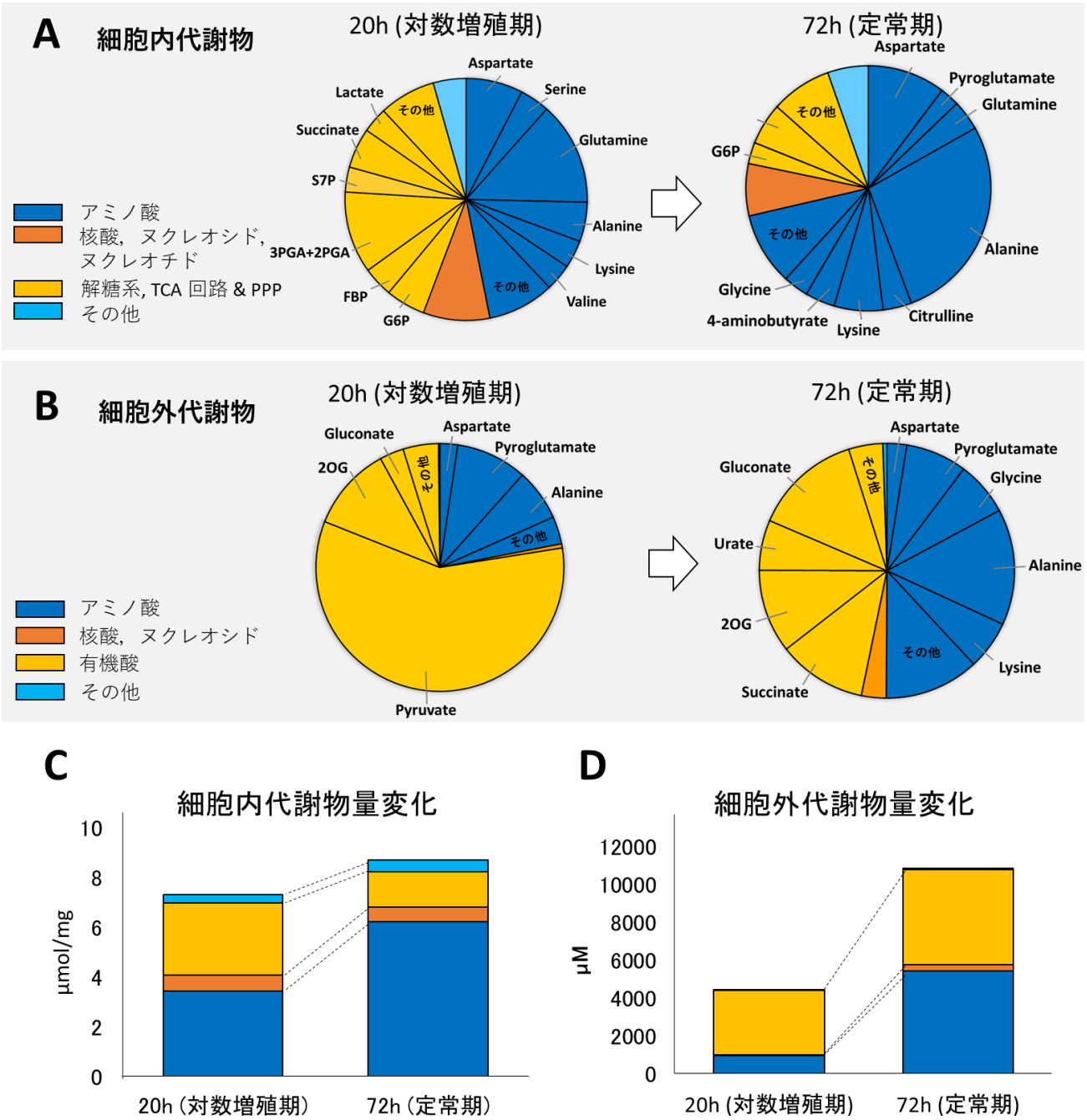


図 2-2　M1146 株における一次代謝物絶対定量結果 (20h: 対数増殖期，72h: 定常期)

(A)(B)は総量比で 2%以上のものを代謝物名と共に示している．それぞれ

(A) 細胞内代謝物量, (B) 細胞外代謝物量の平均値 (N=3) の総量における量比を示す．代謝物の分類は，補助資料 図表 S8 に，各分類における比較は補助資料 図表 S9 および S10 に記載している．

また代謝物総量の比較を(C) 細胞内代謝物 (D) 細胞外代謝物量それぞれに対して示す．

興味深いことに，細胞内代謝物分析結果において，対数増殖期である 20h では，解糖系，クエン酸回路 (TCA 回路)，PPP (ペントースリン酸経路) などの多くの中央代謝産物が主な代謝物を占めるのに対して，72h ではそれらの中央代謝産物は主な代謝物ではなくなっていることが示された．細胞外代謝物分析においても同様に，20h では中央代謝産物の一種であるピルビン酸の蓄積が観測されるのに対して，72h ではその蓄積が解消されていることが示された．

ここで代謝物量総量の変化を図 2-2 (C) および (D) に示す．本結果において細胞内代謝物量は微増であったのに対して，細胞外代謝物量の大幅な増加が観測された．本培養系では富栄養培地ではなく，グルコースを単一炭素源，グルタミン酸を単一窒素源としている最小栄養培地を使用しているため，細胞外代謝物量の大幅な増加は理に適っている．

各培養段階における細胞内の中央代謝物の濃度変化を表 2-2 に示す．この表からもほぼ全ての中央代謝物の濃度が対数増殖期から培養定常期にかけて低下していることが示された．

また定量結果の信頼性を示すために，各代謝物の添加回収試験結果を補助資料 図表 S11 に示すが，ほぼ全ての代謝物が高い回収率 (70 ~ 100%) を示した．

表 2-2 異なる培養段階における中央代謝物濃度の変化 (M1146 株: 20h および 72h)

代謝物	平均値		標準偏差	
(μmol/mg)	20h	72h	20h	72h
G6P	3.87E-01	2.46E-01	2.06E-02	1.68E-02
F6P	7.27E-02	3.38E-02	8.86E-03	3.33E-03
G1P	1.47E-02	6.25E-03	8.02E-04	7.18E-04
FBP	2.94E-01	6.64E-02	3.04E-02	1.04E-02
GAP	1.51E-02	8.16E-03	6.81E-04	2.14E-03
DHAP	2.52E-02	1.54E-02	1.59E-03	6.25E-03
3PGA+2PGA	7.99E-01	1.09E-01	9.55E-02	1.87E-02
PEP	4.93E-03	7.01E-03	1.03E-03	1.69E-03
Pyruvate	1.42E-01	1.59E-02	3.79E-02	9.53E-04
6PGA	5.91E-03	4.50E-02	1.49E-03	9.25E-03
Ru5P	2.74E-02	1.42E-02	7.19E-03	2.90E-03
S7P	2.44E-01	8.16E-02	9.38E-02	5.96E-03
R5P	2.30E-02	7.02E-03	5.77E-03	7.94E-04
F1P	2.12E-02	1.16E-02	4.07E-03	5.03E-04
R1P	1.62E-02	3.98E-02	2.28E-03	7.16E-03
Acetyl-CoA	3.25E-02	2.46E-02	7.46E-04	1.78E-03
Citrate	9.84E-02	2.47E-02	2.03E-02	1.76E-03
2OG	3.18E-02	5.30E-02	5.61E-03	3.48E-03
Succinyl-CoA	8.82E-03	4.97E-03	1.78E-03	7.63E-04
Succinate	3.91E-01	4.80E-01	2.91E-02	1.80E-02
Fumarate	2.92E-03	3.95E-03	1.07E-03	2.39E-04
Malate	9.06E-03	2.87E-02	1.69E-03	3.89E-03
Lactate	2.48E-01	9.86E-02	2.48E-01	4.89E-02

2.3.3 *Streptomyces coelicolor* M1146 株の経時変化トランスクリプトーム解析

2.3.2 において代謝物絶対定量による代謝物量の主な変化の特定を行ったが，2.3.3 では遺伝子発現レベルでの変化の特定を試みた．各培養時間において遺伝子発現レベルでの変化を特定するために, 本株の各培養段階 (培養開始後 18h, 20h, 22h, 26h, 30h, 32h, 34h, 38h, 44h, 50h) において菌体を回収し，抽出および精製した RNA サンプルを基に RNAseq によるトランスクリプトーム解析を行った．上記において中央代謝産物の量が定常期では，対数増殖期と比べて減少が見られたことから，それらの代謝物を合成する酵素をコードする遺伝子の発現レベルも, 時間を経るにつれて減少すると考えた．以下に経時変化によるそれぞれの遺伝子の発現レベルの変化を，ヒートマップ解析を用いて示す (図 2-3).

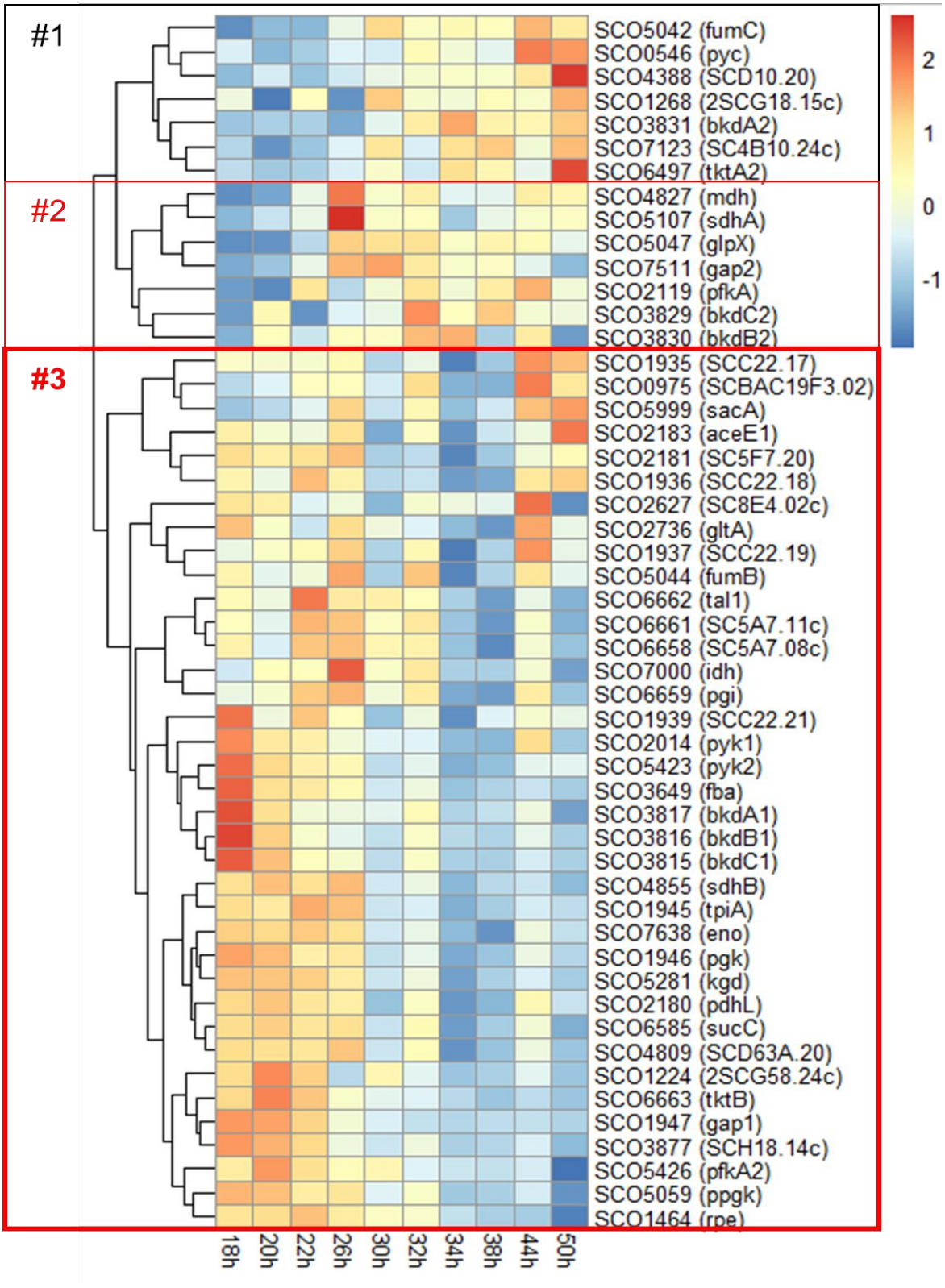


図 2-3 M1146 株における中央代謝に関連する遺伝子の発現レベルの変化

リードカウント量をオートスケール化 (平均が 0 に，分散が 1 になる正規化) した値をヒートマップにて示す．赤色が相対的な高発現を示す．縦軸は Locus_tag を示す．

図 2-3 に示されるように，中央代謝に関連する遺伝子の発現レベルは，時間を経るに連れて増加するもの (#1), 増加して減少するもの (#2) および時間を経るにつれて減少するもの (#3) に分類され，多くの遺伝子が時間を経るにつれて発現レベルが減少する遺伝子 (#3) に分類された．

中央代謝産物は抗生物質を含む二次代謝の前駆体であるが，本菌株の場合，抗生物質合成代謝は、培地の栄養源が枯渇した定常期においてのみ発現される．例えば，2.3.4 で抗生物質の生産能の指標として使用するアクチノロージンは *S. coelicolor* の培養定常期において生産され，中央代謝に存在するアセチル CoA を前駆体とするが，定常期では対数増殖期と比べてアセチル CoA の減少が観測された (表 2-2)．ここで特定の抗生物質における前駆体の確保という意味では，定常期における抗生物質合成代謝の誘導は抗生物質生産量の増加という観点からは不十分である．本知見から，培地中の基質が十分量存在している，より早い培養段階で抗生物質の合成を開始することが可能になれば，フラスコによるバッチ培養規模においてより高い最終生産量を達成することが可能になるという仮説を挙げた．また，それらの抗生物質の異なる生産時期および異なる最終生産量を有する菌株の作成は，本研究の目的を達成するための戦略として挙げたオミクス解析による表現型解析を介した抗生物質の生産制御機構の解明に寄与することが可能であると推察した．

2.3.4　アクチノロージン生産量の異なる *Streptomyces coelicolor* の表現型の比較

そこで本研究では, *S. coelicolor* によって産生されるアクチノロージン (Act) を抗生物質の生産能の違いを示すモデル抗生物質として採用することで，より早期の培養段階における抗生物質生産能を有する株の選抜ひいては 2.3.3 で提唱された仮説に基づき，早期の培養段階における抗生物質生産を達成することによる抗生物質の高い最終生産量を有する株の選抜を試みた．これはアクチノロージンが中央代謝由来のアセチル CoA を前駆体とすることに加えて，青色を呈するため，培地の色の変化からその生産開始時期を容易に特定することが可能であるためである．加えて緒言で述べた通り，アクチノロージンは抗生物質生産の制御機構解明のためのモデルケースとして使用されてきた経緯を有するため多くの情報が蓄積されている．また 2.3.3 で述べた通り，抗生物質の異なる生産開始時期および異なる最終生産量を有する株を選抜することは，本研究における目標達成においてオミクス解析による表現型解析のための有用な試料となる．ここでアクチノロージンにおける青色を呈する特性は，オミクス解析に供する試料取得のための培養段階を正確に特定するという点においても利点を有する．

抗生物質生産量を向上させる方法としては，生合成遺伝子導入 (Heterologous expression)が有効であり [86] [87]，本手法の現在までに 100 例を超す適用例が報告されている [88]．抗生物質の生産時期を早める方法としては，リボソーム工学に基づき，RNA ポリメラーゼの β サブユニットをコードする遺伝子である *rpoB* に対して部分変異を起こす手法が有効である [89]．本手法は，部分変異により，RNA ポリメラーゼが抗生物質代謝の誘導に必要な ppGpp を必要としなくなることを活用する手法である [89].

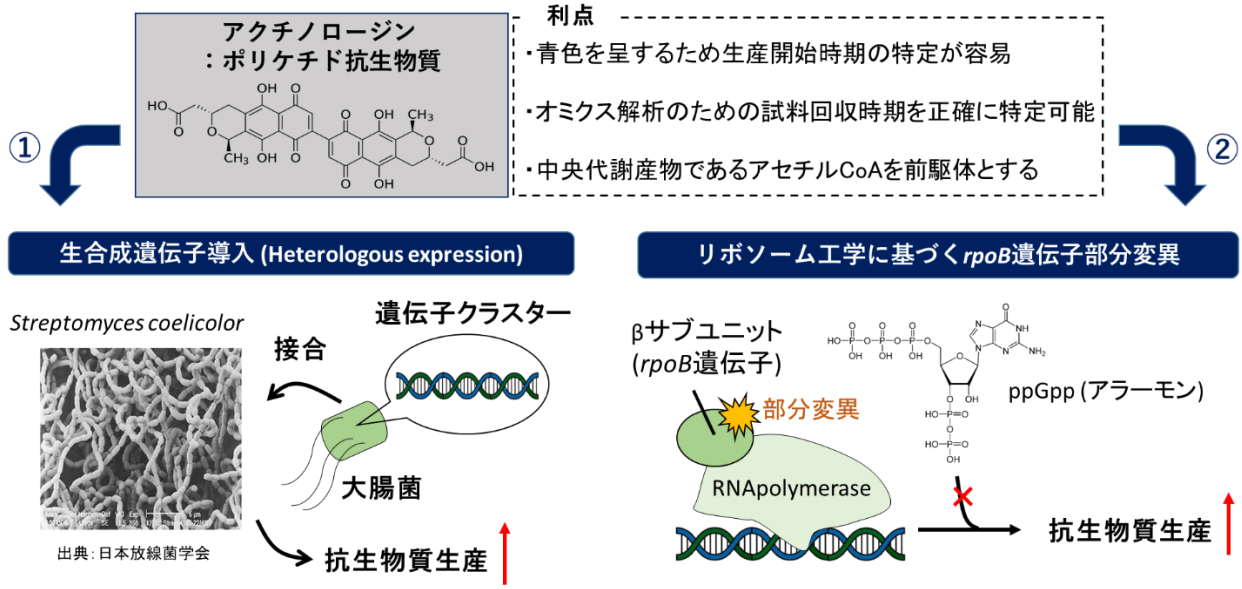


図 2-4 本研究における抗生物質生産能を改変するために使用した手法の概略図

そこで本研究では，図 2.4 で示すように生合成遺伝子導入および *rpoB* 部分変異によってアクチノロージンの生産時期および生産量を改変した *S. coelicolor* の取得を行った．図 2-5 に本研究で行ったメタボローム解析による比較に供した菌株を図解する．

初めに生合成遺伝子クラスターの *S. coelicolor* への表現型への影響を特定するためにアクチノロージン非生産株である M1146 株，および野生株である M145 株を生合成遺伝子導入に供することでアクチノロージン合成遺伝子クラスターを外来から導入した M1146+ACT 株および M145+ACT 株を取得した． 次に *rpoB* 遺伝子に対する部分変異導入の *S. coelicolor* の表現型への影響を特定するために M1146+ACT 株において *rpoB* 遺伝子に対して部分変異[C1298T]を施した株である M1152+ACT 株 [80] を作成することでアクチノロージンをより早い培養段階で生産することを可能にした菌株を取得した．原理上では M1146+ACT 株および M145+ACT 株はコントロール株と比較してアクチノロージンのより高い最終生産量を有する株であり，M1152+ACT はコントロール株と比較して，より早期の培養段階においてアクチノロージンを合成可能であると推察された．各菌株の表現型比較を行うことによって本仮説の整合性の確認を行った．

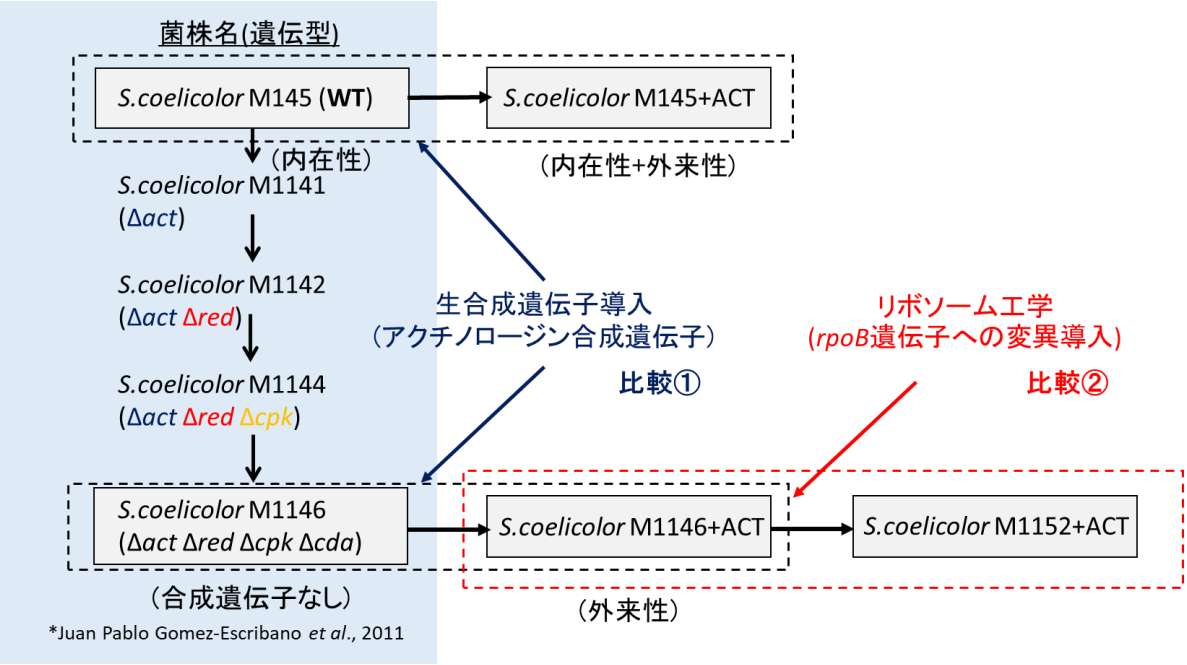


図 2-5 本研究においてメタボローム解析に供した菌株の概略図

生合成遺伝子導入によってアクチノロージン合成遺伝子クラスターを外部から導入した株と導入していない株の比較を行った (図 2-5). 比較対象は以下の通りである.

①：M1146 株および M1146+ACT 株の比較

②：M145 株および M145+ACT 株の比較

また *rpoB* 遺伝子への部分変異を導入した株と導入していない株の比較を行った. 比較対象は以下の通りである.

③：M1146+ACT 株および M1152+ACT 株の比較

それぞれの比較において，菌体量，抗生物質量，培地成分消費量の三点において比較を行った. まず比較①および比較②の比較結果を図 2-6 および図 2-7 に示す.

比較①

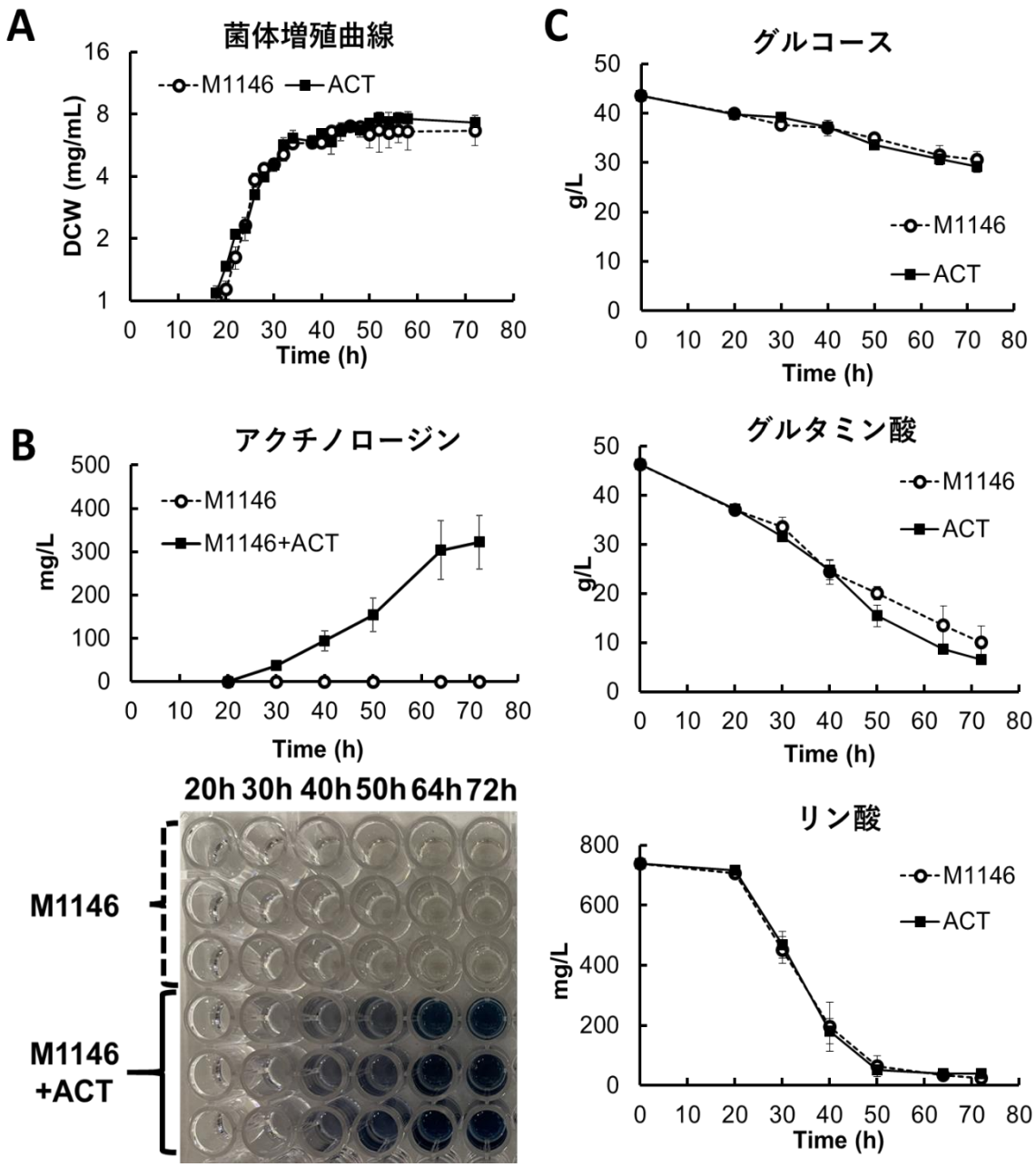


図 2-6 M1146 株および M1146+ACT 株の比較

(A)：菌体増殖曲線の比較　(N=3)

(B)：アクチノロージン(Actinorhodin) 生産量の比較 (N=3)

(C)：培地中基質成分 (上からグルコース，グルタミン酸，リン酸) の残存量比較 (N=3)

比較②

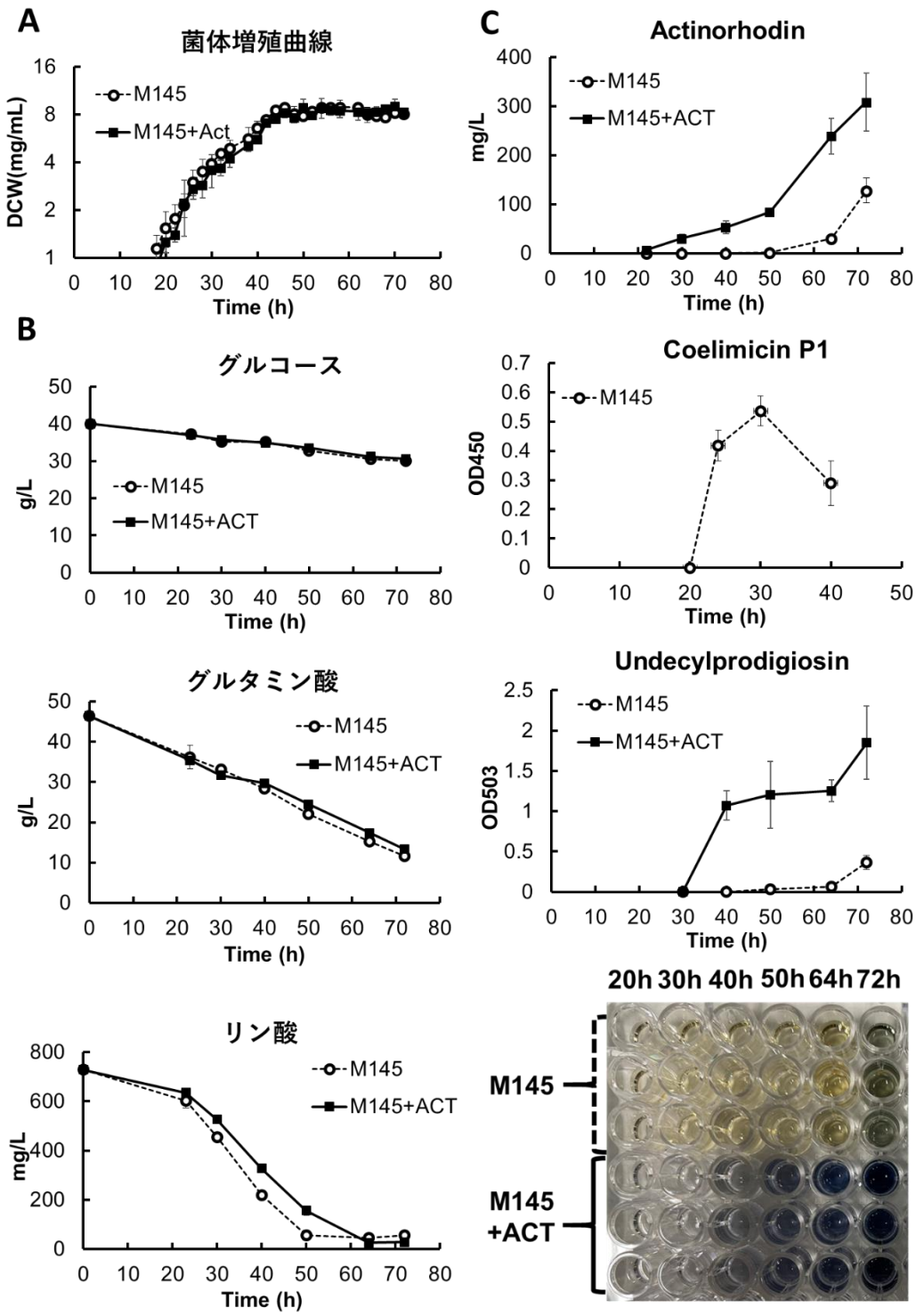


図 2-7 M145 株および M145+ACT 株の比較

(A)：菌体増殖曲線の比較 (N=3)

(B) : 培地中基質成分 (上からグルコース, グルタミン酸, リン酸) の残存量比較 (N=3)

(C) : 抗生物質生産量 (上から Actinorhodin, Coelymycin P1, Unidecylprodigiosine) の比較

過去の研究例では，本研究で使用している最小液体培地と同じ組成を有する液体培地による M145 株の培養が既に行われており，菌体増殖量，三種の抗生物質生産量，培地中基質成分消費量の全てのデータで同様の結果が観測された (図 2-7)．興味深いことに M145 株では，培地中のリン酸源が枯渇した定常期においてのみ，アクチノロージンが生産されているのに対して，生合成遺伝子導入によってアクチノロージン合成遺伝子クラスターを導入した M145+ACT 株および M1146+ACT 株は培地中のリン酸源が枯渇していないにも関わらず，Actinorhodin の生産開始が観測された (図 2-6, 図 2-7)．またアクチノロージン合成遺伝子クラスターを元来有する M145+ACT 株では，M145 株と比較してより多くのアクチノロージン生産が観測された．これは内在性のアクチノロージン合成遺伝子が定常期において活性化されることで，定常期においてアクチノロージン生産量が急増したと予想される．ここで，アクチノロージン合成遺伝子クラスターを 1 コピーずつ有する M1146+ACT 株 (図 2-6B) と M145 株 (図 2-7C) におけるアクチノロージンの最終生産量を比較すると，両株は同数のアクチノロージン合成遺伝子クラスターを有するにも関わらず M1146+ACT 株はより高い最終生産量を示した．ここで，非生産株 M1146 およびアクチノロージン早期生産株 M1146+ACT の対数増殖期における中央代謝産物量を比較すると，アクチノロージンを早期に生産する株において総量の低下が観測され，アクチノロージン合成に使用されていることが示唆された (図 2-8).

上記の結果から 2.3.3 で提唱した前駆体の観点からの早期生産開始の最終生産量増加への優位性に関する仮説が部分的に立証された.

次に *rpoB* 遺伝子への部分変異導入を介した抗生物質生産量改変による比較③の結果を下記に示した (図 2-8)．比較①および比較②と同様に菌体増殖量および培地中基質残存濃度，アクチノロージンの生産開始時期および最終生産量の比較を行った.

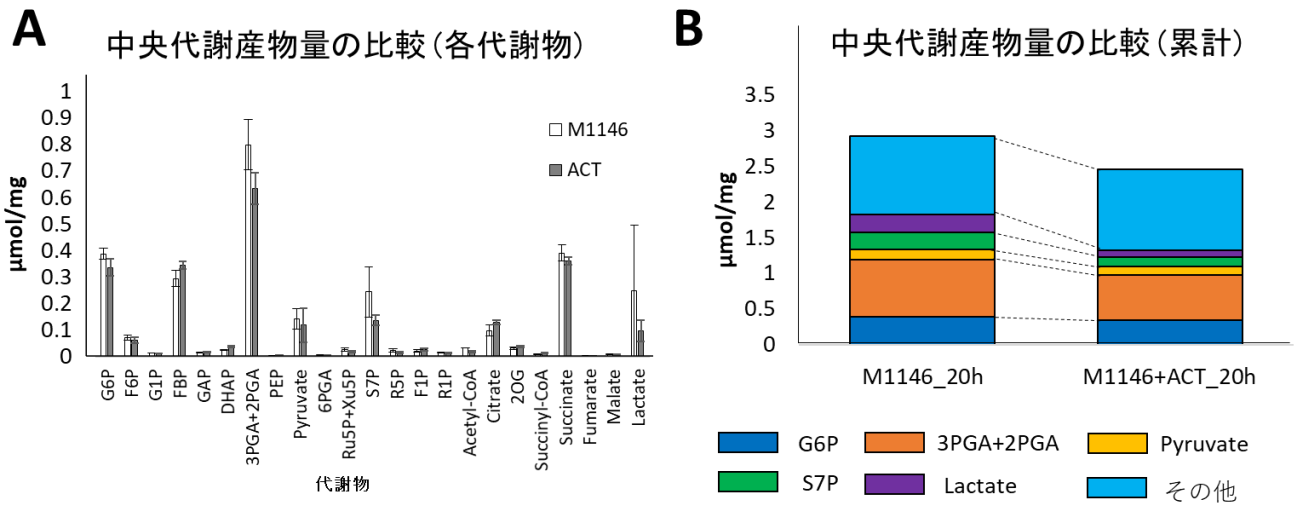


図 2-8 対数増殖期 (20h) における中央代謝物量の比較 (M1146 株, M1146+ACT 株)
(A) 各中央代謝産物量の比較 (N=3). 白色図が M1146, 灰色図は M1146+ACT を示す. (B) 累計の中央代謝物量変化を示す. ここでは, 低下を示したものを代謝物名と共に示す.

比較③

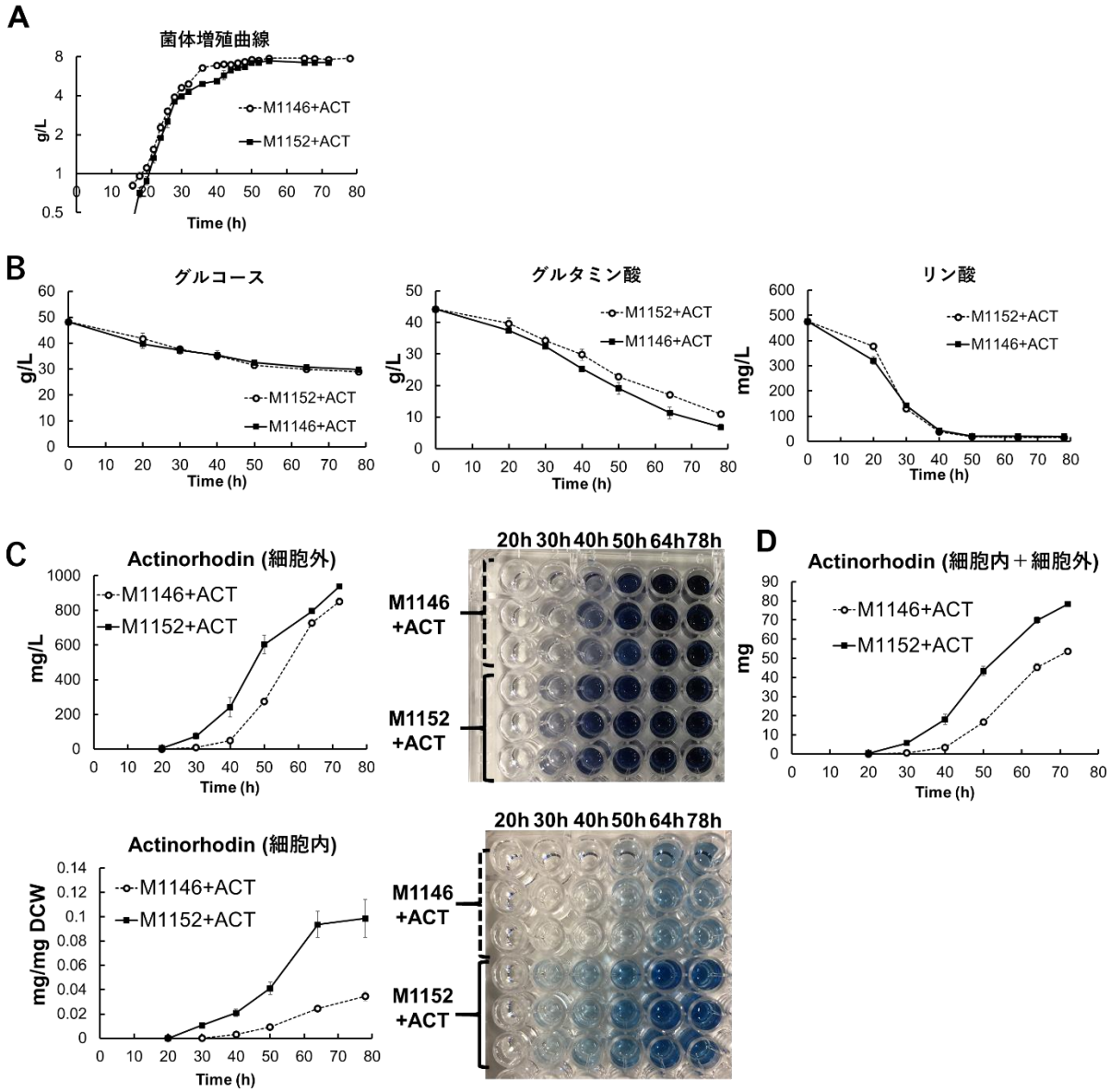


図 2-9 M1146+ACT 株および M1152+ACT 株の比較

(A)：菌体増殖曲線の比較 (N=3)

(B)：培地中のグルコース，グルタミン酸およびリン酸の残存量比較 (N=3)

(C)：培地中の Actinorhodin 生産量比較，細胞内の Actinorhodin 生産量比較 (N=3)

(D) 培養液 50 mL 中の合計 Actinorhodin 生産量比較(細胞内および細胞外の生産量を統合したもの) (N=3)

rpoB 遺伝子に部分変異導入を行った株である M1152+ACT 株は，部分変異導入を行っていない M1146+ACT 株に対して，菌体増殖能の低下 (図 2-9A) およびグルタミン酸消費量 (図 2-9B) の低下が観測された．菌体増殖能の低下は過去の研究における報告例と一致している [80]．M1146+ACT 株と M1152+ACT 株におけるアクチノロージンの生産量比較を行ったところ，既に培地中リン酸源が十分量存在している条件でアクチノロージンの生産を開始していた M1146+ACT 株よりも更に早期の培養時期において M1152+ACT 株はアクチノロージンの生産開始を達成しており，更に細胞外・細胞内および総量 (細胞外＋細胞内) のアクチノロージン生産量は最終菌体回収時期である培養開始後 78h において増加を示した (図 2-9CD)．こちらの結果に関しても，2.3.3 で述べた前駆体の観点からの早期培養開始の最終生産量増加への優位性に関する仮説と一致している．

2.3.5 アクチノロージンの生産量の異なる *Streptomyces coelicolor* のメタボローム解析

2.3.4 において行った比較において，生合成遺伝子導入および *rpoB* 遺伝子への部分変異導入が抗生物質アクチノロージンの生産開始時期早期化および最終生産量増加に有用であることが示され，各菌株におけるアクチノロージンの生産開始時期および最終生産量の違いが観測された．本観測結果はオミクス解析による表現型解析にとって有用な結果であり，比較①～③における各菌株のメタボローム解析によって，抗生物質生産に寄与する可能性のある代謝物を特定可能であると考えた．ここで，より擬陽性の低い仮説提唱を達成するため，本研究では，まず比較①および②の細胞内および細胞外メタボローム解析を行い，それぞれの比較において共通して観測される現象を擬陽性の低いデータとして採用した．その後，得た知見の比較③における再現性確認を試みた．以下の図に比較①と比較②のメタボローム解析結果を各培養時期における代謝物量平均値 (N=3) の各株間での FC 値を用いることで示した．本結果をヒートマップにて示す (図 2-10)．本結果において，cAMP, Cystine, Betaine, PRPP の量増加が示唆された．ここで，これらの代謝物の量の変化を確認したところ，アクチノロージンの生産量の高い M1146+ACT 株および M145+ACT 株における量がアクチノロージン生産量の低い M1146 株および M145 株と比較して細胞内において多いことが示された (図 2-11, 図 2-12)．また cAMP に関しては細胞外においても量の向上が観測され，更に細胞外 cAMP の量変化は各菌株におけるアクチノロージンの生産量変化と強く類似しており, cAMP 量がアクチノロージン生産量と強い相関関係にあることが示された．また，M145 株においてはアクチノロージン以外にも Coelymycin P1 の生産が観測され，Coeymycin P1 の量変化とも cAMP 量は相関関係にあることが示された(図 2-7B)．cAMP と比較して Cysitne, Betaine, PRPP の量は向上しているものの，抗生物質との相関関係にはないことが示された．そのため，本研究では cAMP に着目した．

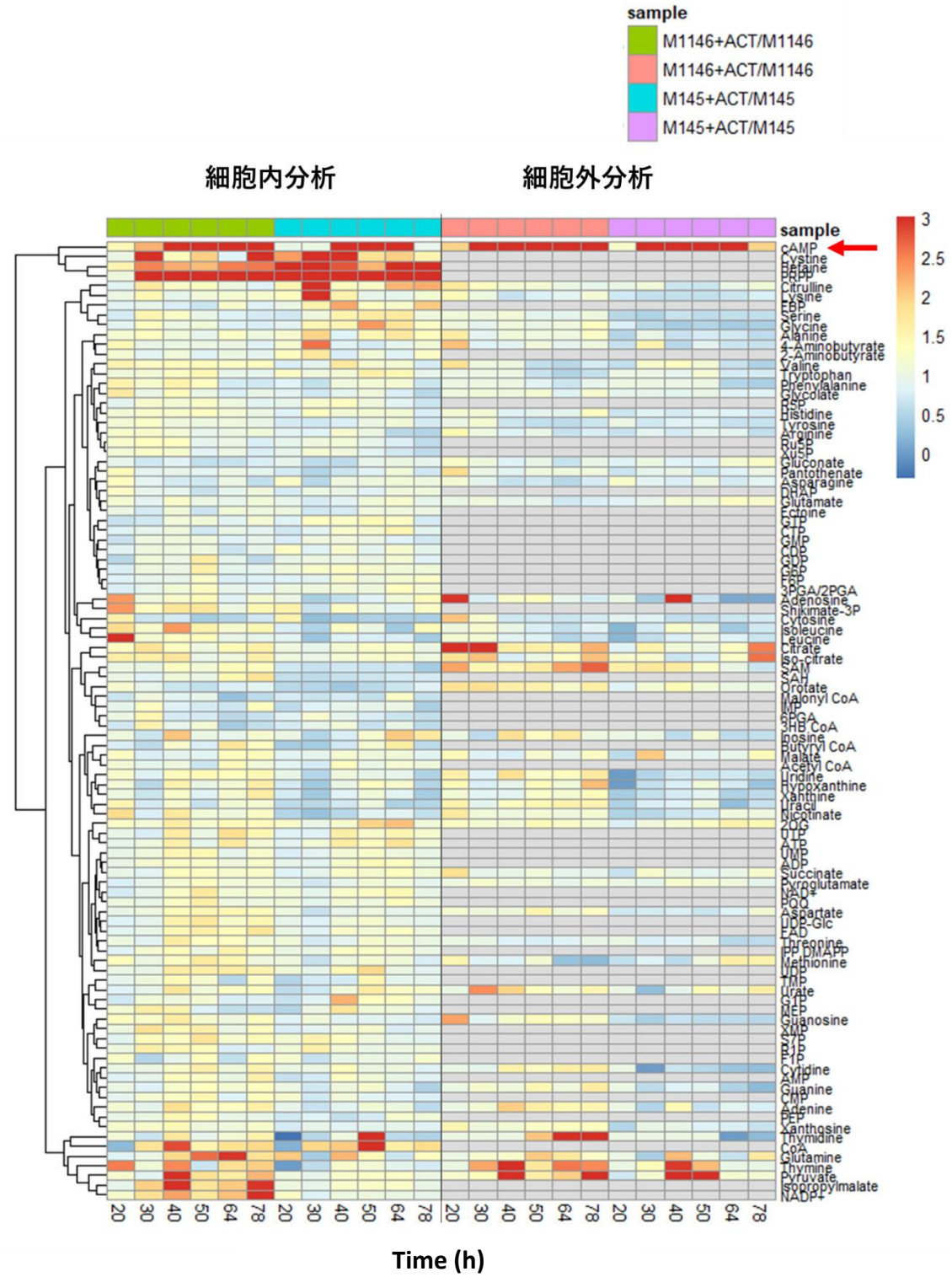


図 2-10 生合成遺伝子導入による各株のメタボロームへの影響

アクチノロージン合成遺伝子を外来から導入していない株における代謝物量平均値 (N=3) に対する，アクチノロージン合成遺伝子を外来から導入した株における代謝物量平均値 (N=3) の各時間の Fold-change を HCA によってクラスタリングしたものをヒートマップにて示している． 左半分：細胞内分析結果を，右半分が細胞外分析結果を示す．

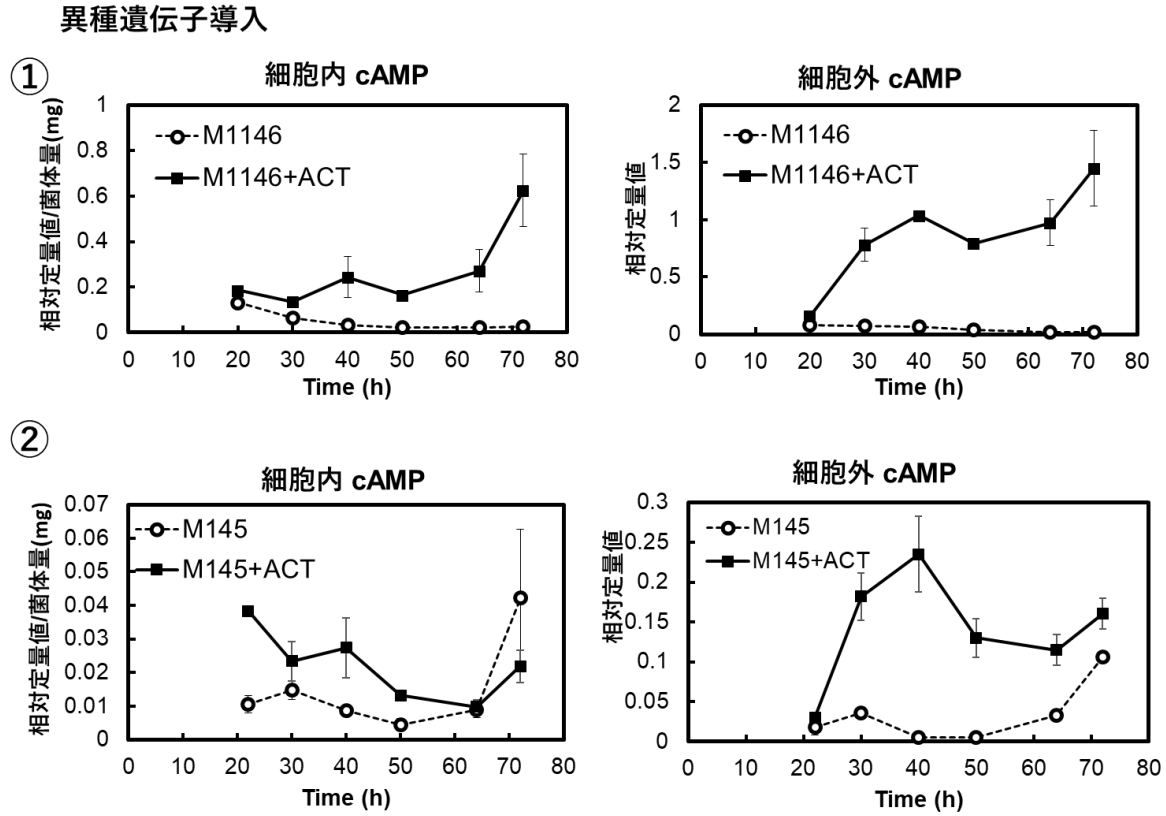


図 2-11　生合成遺伝子導入による cAMP 量変化 (細胞内・細胞外)

①：M1146 株および M1146+ACT 株における細胞内・細胞外の cAMP 量の変化 (N=3)

②：M145 株および M145+ACT 株における細胞内・細胞外の cAMP 量の変化 (N=3)

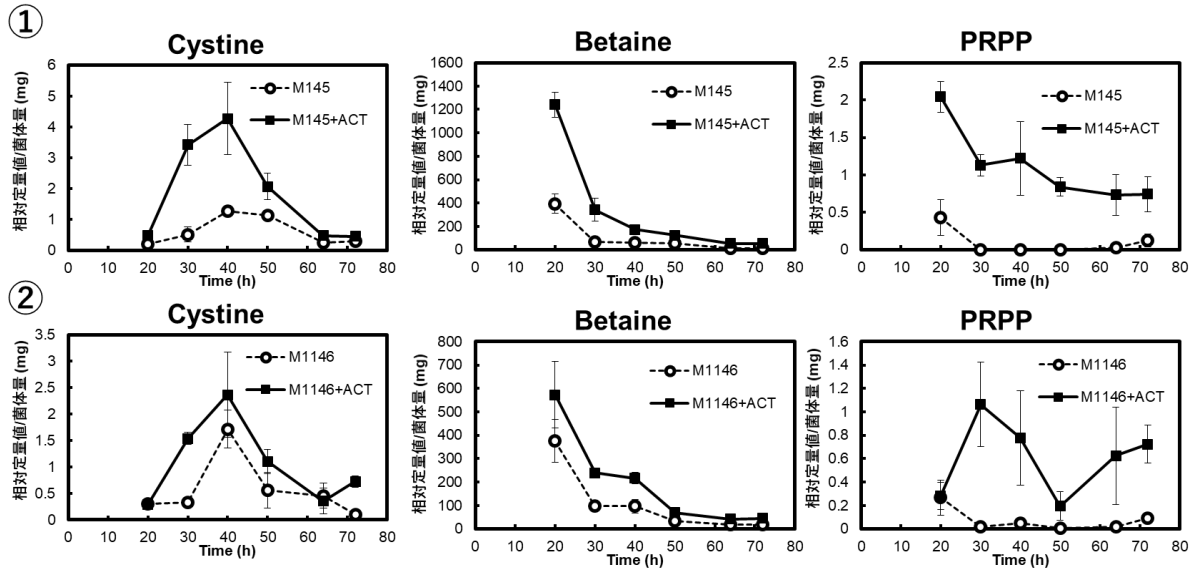


図 2-12 生合成遺伝子導入による Cystine, Betaine, PRPP 量変化 (細胞内)
①：M1146 株, M1146+ACT 株における細胞内 Cytine, Betaine, PRPP 量の変化 (N=3)
②：M145 株, M145+ACT 株における細胞内の Cytine, Betaine, PRPP 量の変化 (N=3)

上記の①および②の比較に加えて，*rpoB* 遺伝子への部分変異導入によるメタボロームへの影響 (比較③) に関しても，上記の比較①および比較②と同様のアプローチを用いることでその影響を特定した(図 2-13)．部分変異を導入した M1152+ACT 株のコントロール株 M1146+ACT 株との比較において，細胞内の cAMP の優位な差は観測されなかったが，比較①および比較②においてより顕著な差が観測された細胞外における cAMP の増加が同様に観測された (図 2-14)．本結果から cAMP の抗生物質生産における重要性が示唆された．

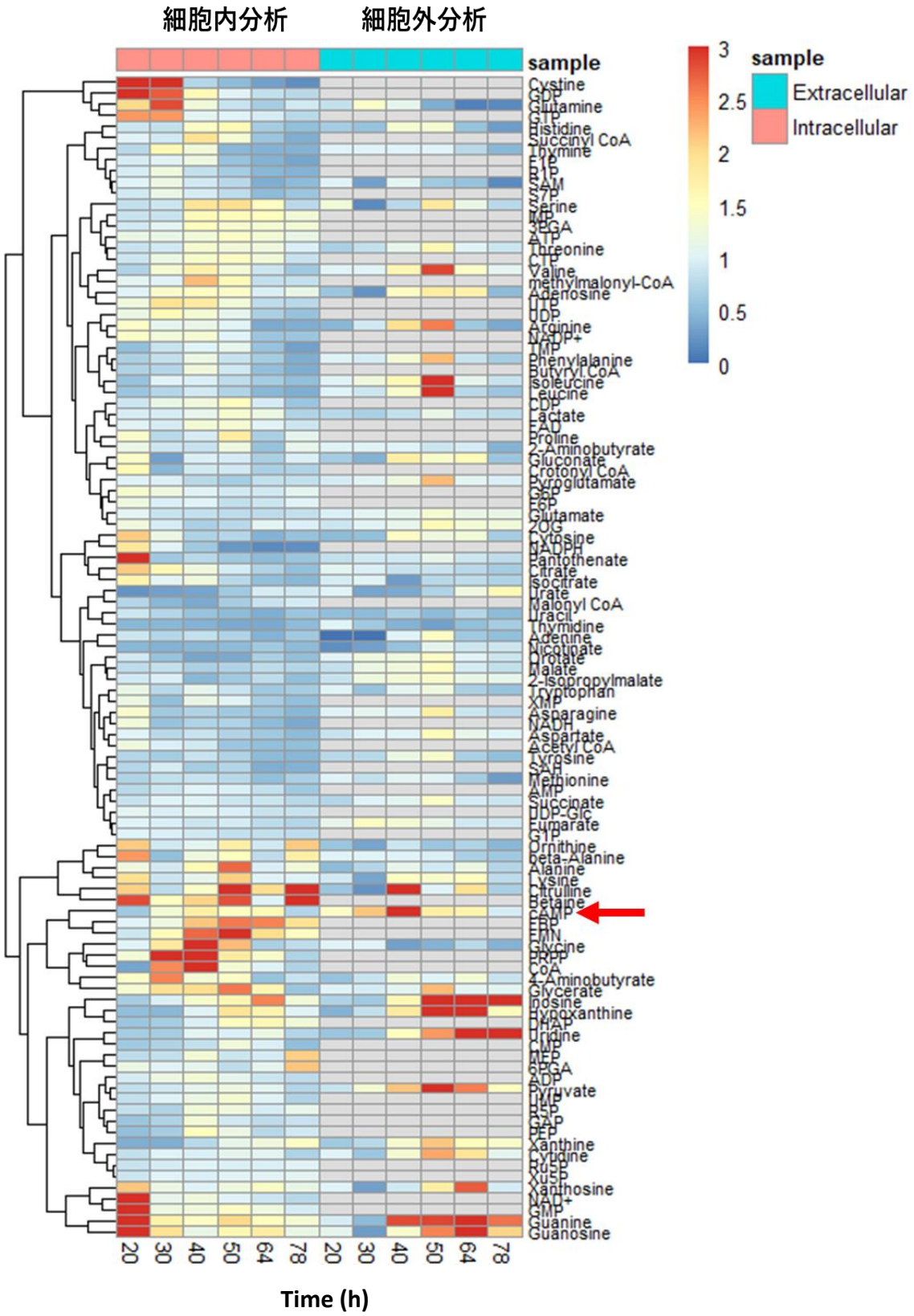


図 2-13 *rpoB* 遺伝子への部分導入によるメタボロームへの変化

M1146+ACT における代謝物量平均値(N=3)に対する，M1152+ACT における代謝物量平均値(N=3)の Fold-change を HCA でクラスタリングしたものをヒートマップ解析で示している．

***rpoB*部分変異導入**

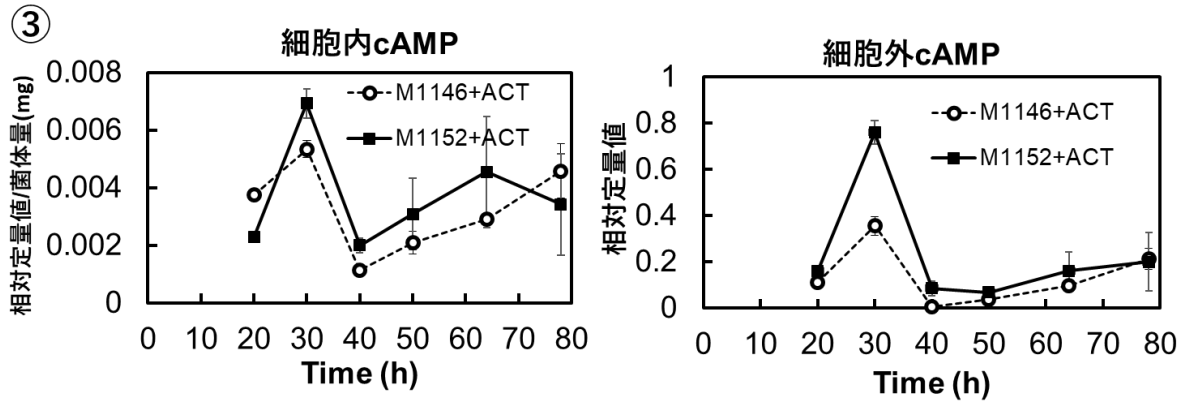


図 2-14　*rpoB* 部分変異導入による cAMP 量変化 (細胞内・細胞外)

M1146+ACT 株および M1152+ACT 株における細胞内・外の cAMP 量の変化 (N=3)

2.3.6　アクチノロージンの合成の有無によるトランスクリプトームへの影響の解析

2.3.5 では，アクチノロージン生産量の異なる菌株のメタボローム解析を行うことで，cAMP 量が *S. coelicolor* による抗生物質生産において重要である可能性が示された．ここでは，先ほどの比較①である M1146 株と M1146+ACT の経時変化トランスクリプトーム解析を行うことで，得た知見を支持する更なる情報の獲得を試みた．菌体増殖曲線とアクチノロージン生産量を基に (図 2-15)，培養開始後の 10 点において菌体を回収し，RNAseq によるトランスクリプトーム解析に供した．それぞれの培養時期のデータを *k*-means クラスタリング解析に供した (図 2-16)．その結果，クラス J およびクラス K の遺伝子が常に高い発現量を示していることがわかった．これらのクラス J およびクラス K のデータをヒートマップにて示した図が図 2-17 である．

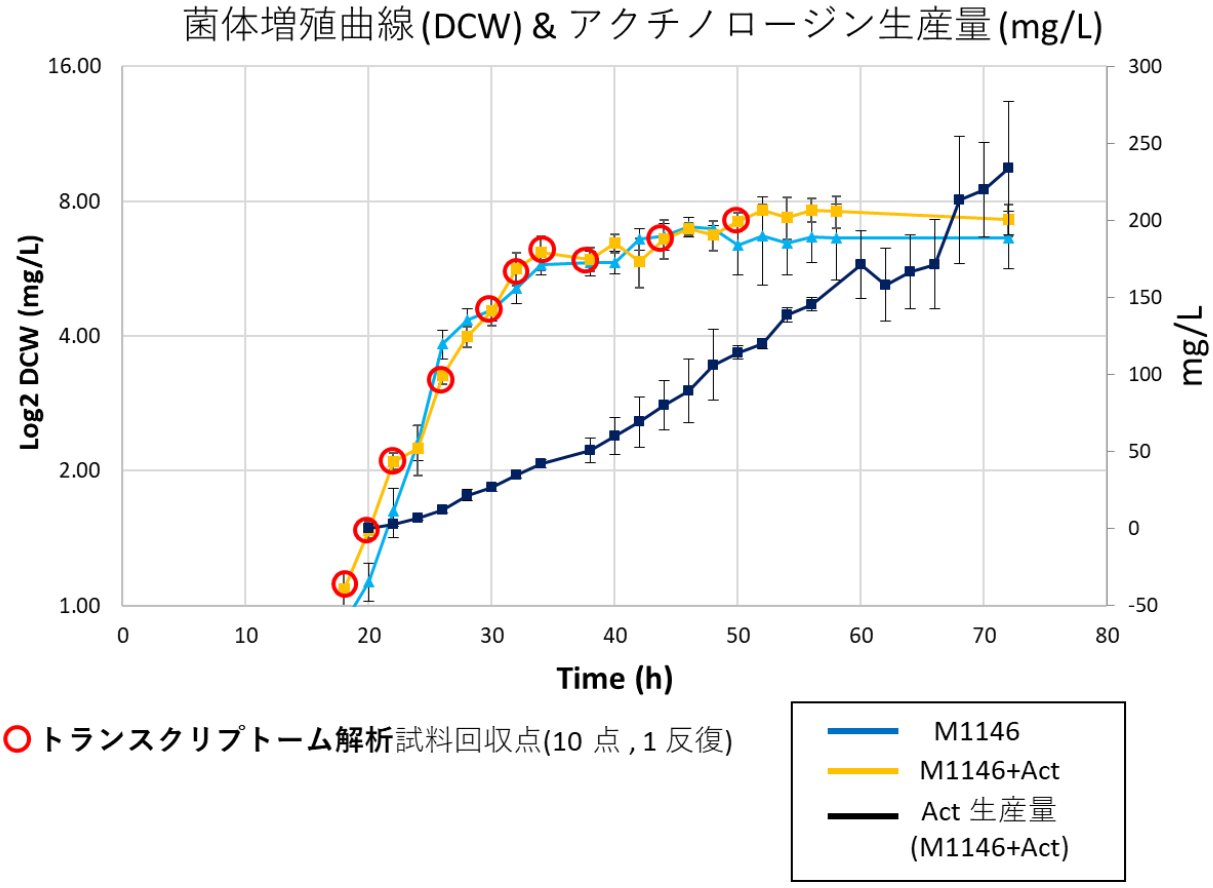


図 2-15　トランスクリプトーム解析に供した試料の回収点の説明図

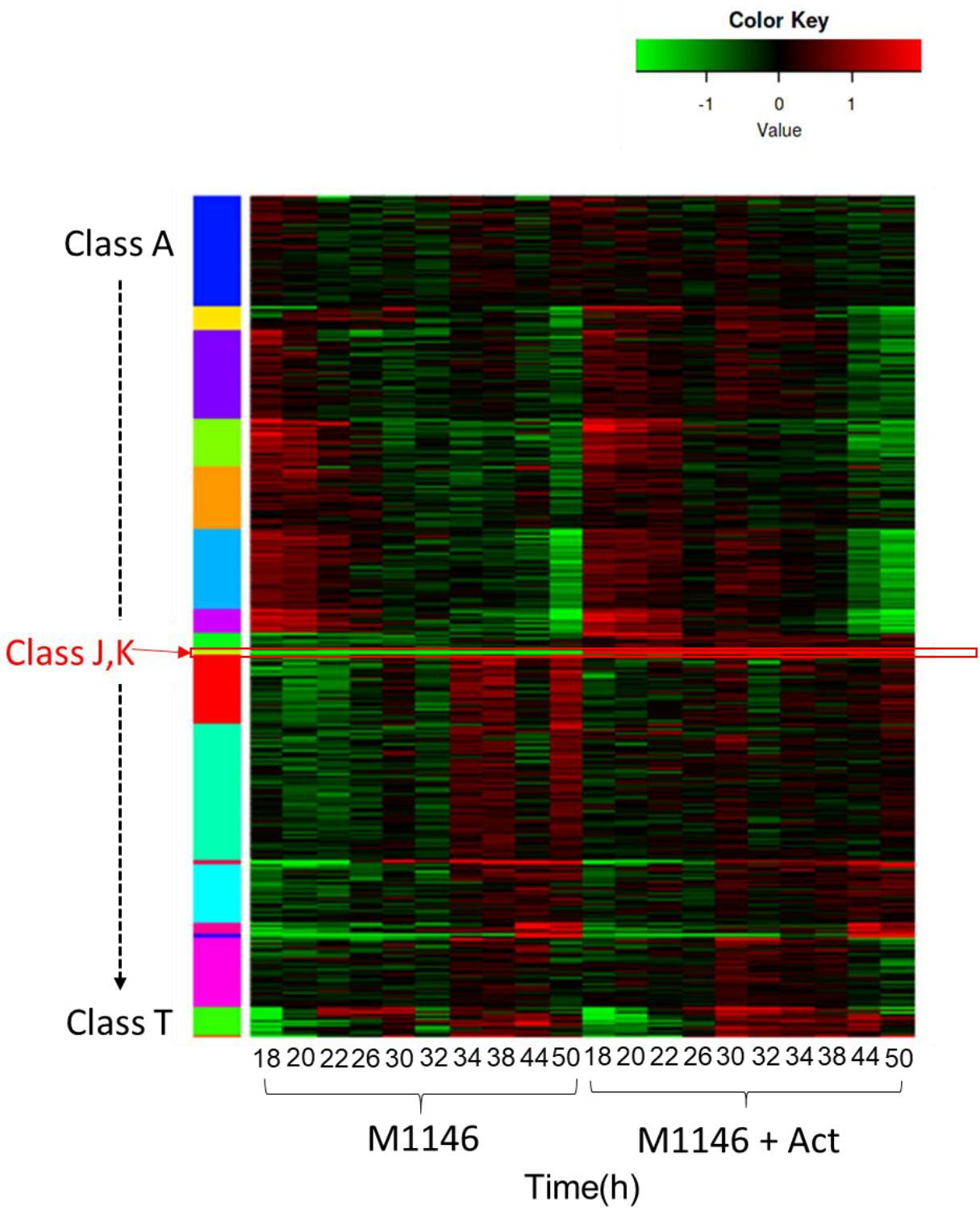


図 2-16　M1146 株および M1146+ACT 株における経時変化トランスクリプトーム解析結果

オートスケーリングデータを k-means クラスタリングに供した．M1146+ACT 株で M1146 株より常に強発現を示したクラス J およびクラス K を赤色の枠で示した．

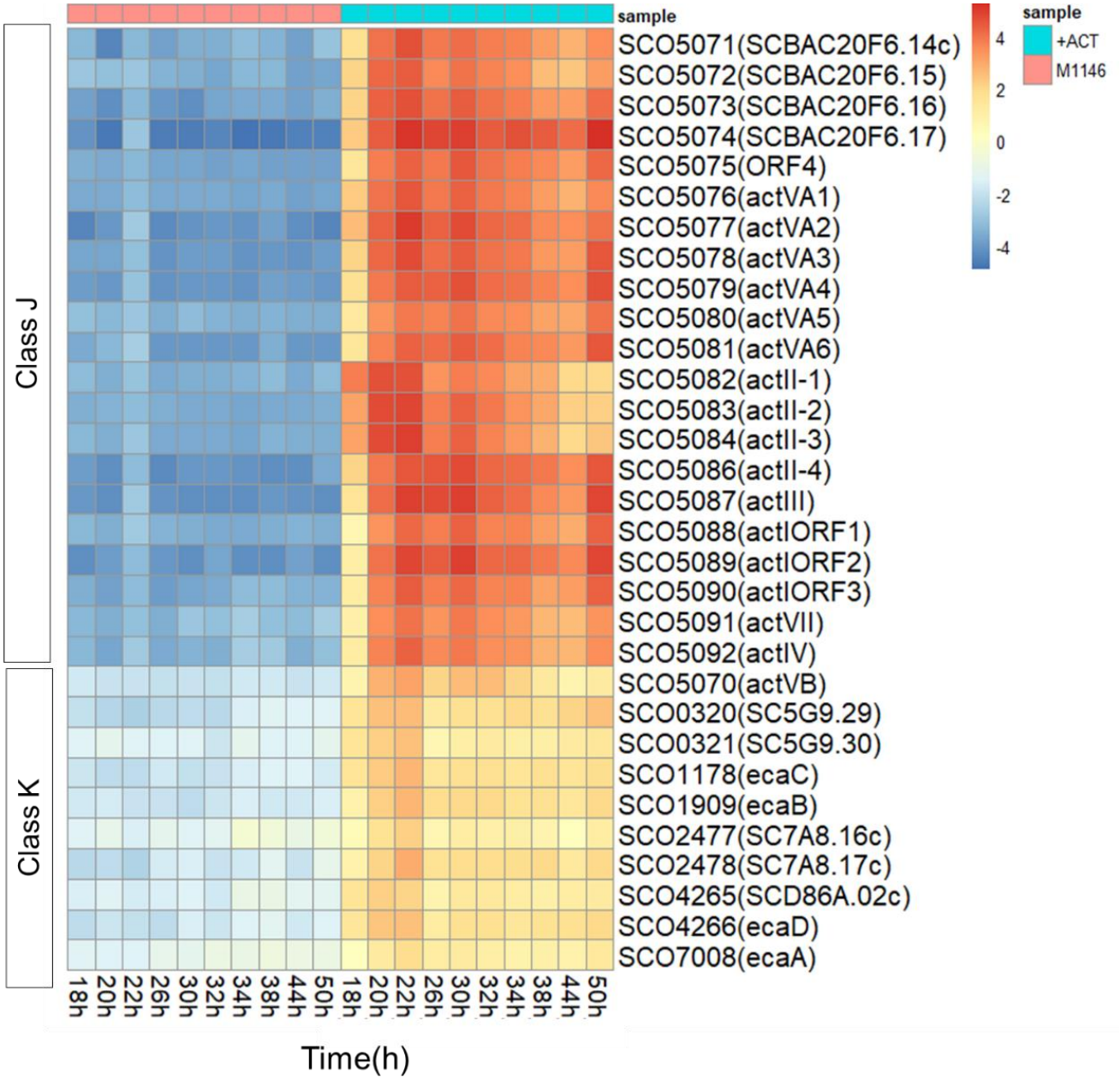


図 2-17　Class J および Class K に属する遺伝子の発現レベル変化

上部の Sample における赤色が M1146 株，青色が M1146+ACT 株を示す．図 2-16 で使用した正規化済みデータをヒートマップにて示した．

表 2-2 Class K に属している遺伝子群リスト

Locus tag	転写産物	特記事項	参照
SCO1178	NAD-dependent epimerase/dehydratase	*SoxR* regulon	Nasser et al., 2014
SCO1909	Monooxygenase	*SoxR* regulon	
SCO4266	oxidoreductase	*SoxR* regulon	
SCO7008	ABC transporter ATP-binding protein	*SoxR* regulon	
SCO2478	Flavoprotein reductase	*SoxR* regulon	
SCO0320	Quinone oxidoreductase	Potential *SoxR* regulon	
SCO0321	carboxylesterase	Potential *SoxR* regulon	

クラス J の遺伝子は全てアクチノロージンの合成遺伝子クラスター由来の遺伝子であるため，これらが過剰に発現されているのは非常に合理的であった．しかしながら，クラス K の遺伝子はアクチノロージンの合成遺伝子クラスター由来ではなかった(表 2-2)．これらの遺伝子は過去の研究において，酸化ストレスによって過剰発現される *soxR* のレギュロンであることが示されている [90]．また，アクチノロージンの抗菌作用の作用機序は酸化ストレスと同様の作用機序であることが知られており [91]，*soxR* のレギュロンはアクチノロージンによって発現レベルが活性化されることが知られている [92 93]．よって M1146+ACT は M1146 と比べてアクチノロージンによる強い酸化ストレスを受けていることが示され，以降に行うトランスクリプトーム解析では，アクチノロージンを生産しない株で行う必要性が示唆された．

ここで M1146 株および M1146+ACT 株の経時変化トランスクリプトーム解析において，発現量向上を示した遺伝子に対して GESA 解析を適用することで，同様の発現レベル変動を起こしている遺伝子群の特定を試みた．

最も有意に濃縮 (Enrichment) が観測されたのはビオチンの合成経路であった (図 2-18A). ビオチンはアセチル CoA カルボキシラーゼの触媒によるアセチル CoA からマロニル CoA を合成する反応に必要なビタミンであり, 本経路関連遺伝子の濃縮はマロニル CoA 合成およびそのアクチノロージン合成への利用のためであると考えられた. マロニル CoA 量を分析したところ, マロニル CoA がより早い段階で消費されていることが示され, アセチル CoA カルボキシラーゼをコードする 2 つの遺伝子レベルの有意な上昇 (FDR < 5%, Log2FC > 0.5) が観測された (図 2-18B).

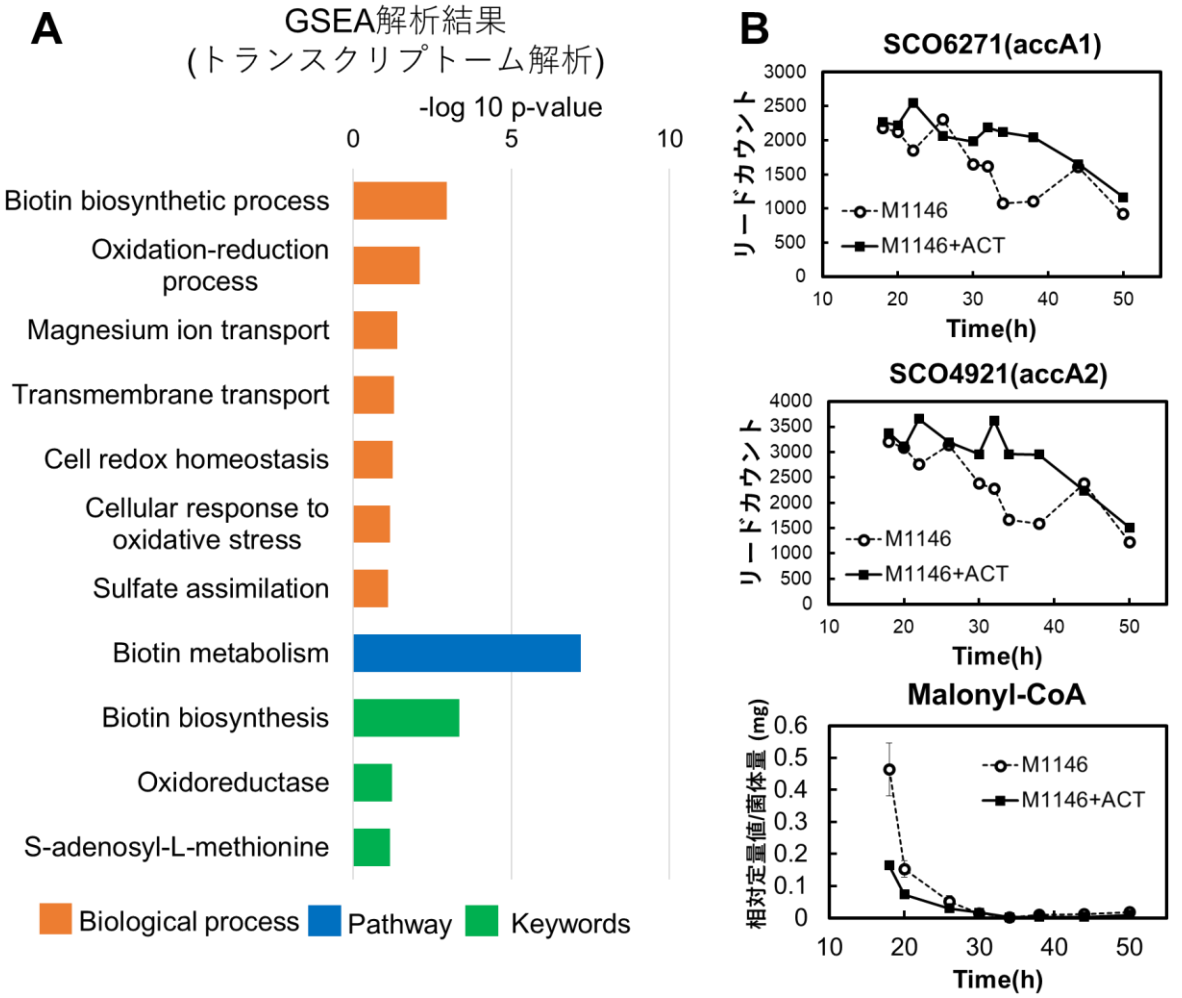


図 2-18 M1146+ACT 株において発現量が向上した遺伝子の GSEA 解析結果
(A) GSEA 解析結果. オレンジ色が Biological Process (生体プロセス), 青色が Pathway (代謝経路), 緑色が Keywords (キーワード)を示す. 詳細を補助資料 S13 に示す.
(B) アセチル CoA カルボキシラーゼの発現量変化ならびにマロニル CoA 量の比較 (N=3). 白抜き丸チャートが M1146, 黒色チャートが M1146+ACT を示す.

また，cAMP を合成する酵素 adenylate cyclase および分解する酵素 phosphodiesterase をコードする遺伝子の発現レベルを M1146 および M1146+ACT で比較したところ，それぞれ有意な差を示さなかったが， adenylate cyclase および phosphodiesterase をコードする遺伝子の発現量のある程度の増強が観測された (図 2-19A)．両遺伝子の発現量の増強によって，増大した cAMP 量のホメオスタシス (恒常性)[94] を保とうとしていると考えられる．また有意な差は観測されなかったが，ATP の減少ならびに AMP の増加が観測され，cAMP 関連酵素をコードする遺伝子の発現変化と矛盾しない結果が観測された (図 2-19B)．しかしながら，cAMP 量を向上させた要因は特定されなかった．

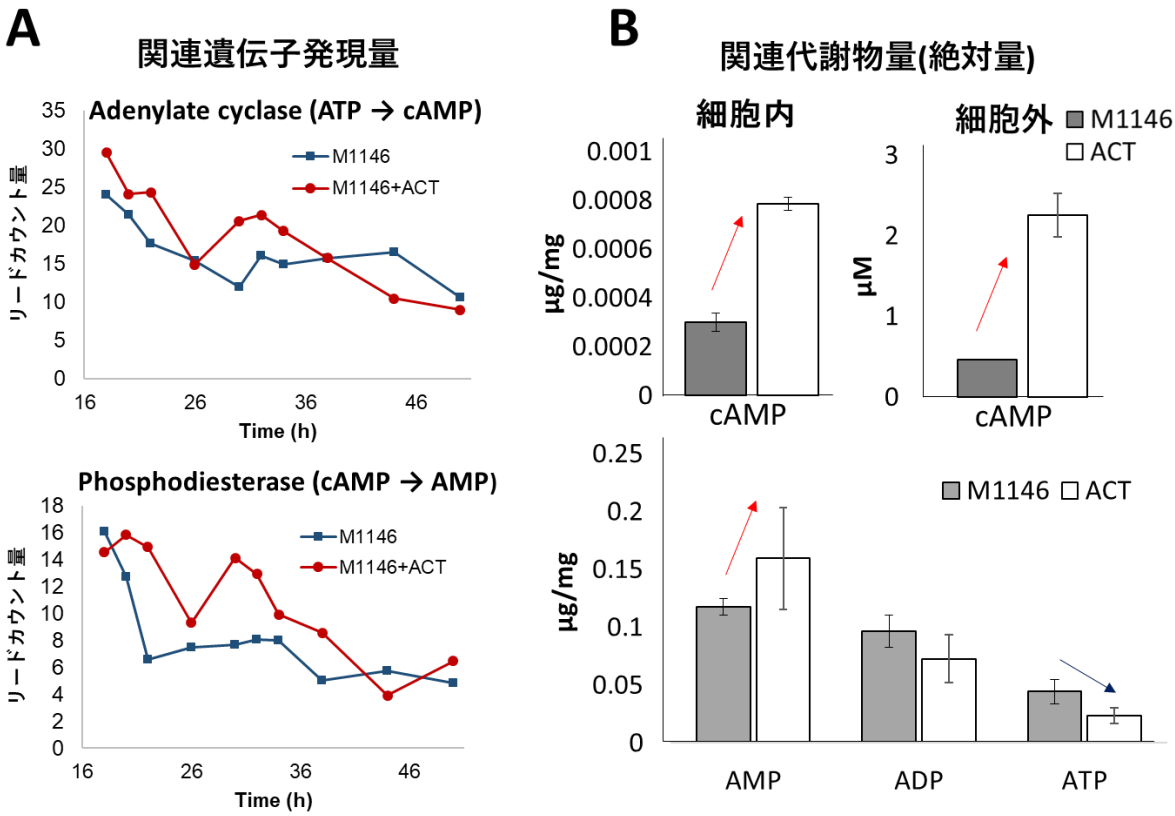


図 2-19 cAMP 合成酵素および分解酵素をコードする遺伝子の発現レベル (TPM 正規化) の比較ならび cAMP 関連代謝の量比較

(A) adenylate cyclase ならびに phosphodiesterase をコードする遺伝子の発現量

(B) 培養開始後 72 時間後における cAMP ならびに AMP, ADP, ATP の量比較 (N=3)

原核生物における cAMP は cAMP 受容体タンパク質である CRP と結合することで各種制御遺伝子に直接作用することで，各種制御機構を制御している [95]．ここで CRP をコードする遺伝子 SCO3571 の遺伝子発現レベルの比較を M1146 株ならびに M1146+ACT 株にて行ったが，培養中期において多少の増加を示したものの，有意な発現量向上は観測されなかった (図 2-20).

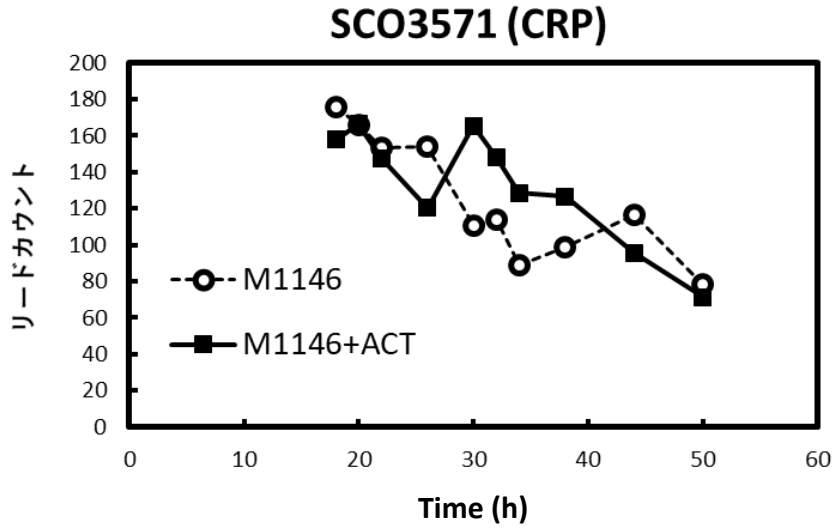


図 2-20 CRP をコードする遺伝子の発現レベルの比較

白抜き丸チャートが M1146, 黒色チャートが M1146+ACT を示す．リードカウントは TPM 正規化によって正規化された.

大腸菌に示されるように原核生物における cAMP は CRP と結合することによって CCR (カーボンカタボライト抑制) に関与していることが知られているが [96], *Streptomyces* 属においては本制御機構を有さないことが明らかになっている [97]．そのため，本博士学位論文では CCR に関する議論は行わない.

2.4 小括

本章では，*S.coelicolor* の中でも，生合成遺伝子導入による抗生物質生産のための宿主株として頻用されている M1146 株において，菌体成長を行う対数増殖期および抗生物質を生産する定常期において菌体試料および培地試料を取得し，細胞内および細胞外に存在する一次代謝物の網羅的な絶対定量を行った．その結果，上記の２つの培養段階における主な代謝物変化として，中央代謝 (解糖系，クエン酸回路，ペントースリン酸経路) の代謝物の減少が観測された．RNAseq を用いたトランスクリプトーム解析によって遺伝子発現レベルからの情報を取得した結果，中央代謝に関連する多くの遺伝子の発現量が，培養が進むにつれて減少することが示され，遺伝子発現レベルにおいても同様な結果が得られた．本結果は菌体増殖に関連する代謝から抗生物質合成代謝への変遷の PhoR-PhoP による制御という過去の知見とも合致している [49].

抗生物質の多くは培地中の成分が枯渇した定常期において合成されることが明らかになっているが，定常期においては特定の抗生物質の前駆体となる中央代謝産物の量が減少している培養段階であり，高生産量を達成するためには適さないことが示された．本知見に基づき，前駆体量が多い培養段階において抗生物質を生産する代謝を誘導することによって抗生物質の最終的な高生産量を達成可能であるという仮説を提唱した．抗生物質生産代謝を誘導する有効な手法としては，生合成遺伝子導入およびリボソーム工学に基づく *rpoB* 遺伝子への変異導入 [89] が知られており，本研究ではアクチノロージンをモデル抗生物質として，両手法を *S.coelicolor* に適用した．結果的に早期の培養段階における抗生物質の生産開始は最終生産量の向上に寄与することが示された．また，本実験で使用された菌株は異なる抗生物質生産開始時期および異なる最終生産量を示したことから，オミクス解析による表現型解析に適していると考えられた．これらの菌株のメタボローム解析を行うことで細胞内および細胞外における cAMP 量が抗生物質生産開始時期および生産量と相関関係にあることが示され，cAMP が *S.coelicolor* における抗生物質生産において重要であるという仮説が提唱された．

第三章　放線菌 *Streptomyces coelicolor* における cAMP 添加のマルチオミクス解析

3.1 緒言

第二章では，アクチノロージンの生産開始時期および最終生産量の異なる *S. coelicolor* 株のメタボローム解析を行うことで，細胞内・細胞外における cAMP の量が，*S. coelicolor* によって生産されるアクチノロージンの生産開始時期および最終生産量に相関関係にあることが示された．本結果から，*S. coelicolor* において cAMP のアクチノロージンを含む抗生物質生産への重要性の可能性が示唆された．

cAMP はアデノシン三リン酸 (ATP) のリボースの 3'および 5'位とリン酸基が環状になっている分子である．cAMP の生体内における役割は真核生物と原核生物で大きく異なっており，放線菌 *S. coelicolor* を含めて，その詳細を下記の表 3-1 に記載する．

表 3-1 真核生物および原核生物における cAMP の生体内における機能

	例	cAMP 依存性 PKA	CRP の有無	CCR への関与
真核生物	*Saccharomyces cerevisiase*	あり	なし	なし
原核生物	***Streptomyces coelicolor***	なし	あり	なし
	Streptomyces griseus	なし	あり	なし
	Escherichia coli	なし	あり	あり

PKA: Protein kinase A, CRP: cAMP receptor protein, CCR: Carbon catabolite repression

真核生物における cAMP の機能は，ホルモンなどの外部シグナルに応答した後の二次メッセンジャーとしての機能が知られており，cAMP が cAMP 依存性キナーゼ (PKA) に作用することで，カスケード的に各種遺伝子の発現レベルを間接的に制御している[98]．それに対して，原核生物における cAMP は異なる機能を有しており，最も知られている例が大腸菌の CCR (カーボンカタボライト抑制) への関与である[96]．これは，培地中のグルコースの量によって cAMP の量が制御され，グルコース枯渇時に cAMP が CRP (cAMP 受容体タンパク質) と結合することで，cAMP-CRP が直接的に DNA 鎖に結合し，遺伝子発現を制御する[95]．興味深いことに，*S.coelicolor* や *S.griseus* における cAMP はカーボンカタボライト制御には関与していないことがわかっている[97]．過去の *S. coelicolor* における cAMP の機能解析に関する研究においては，cAMP を培養培地に添加することで *S. coelicolor* におけるアクチノロージンの生産量を増大させた研究例 (*データ未記載)[99] および，cAMP の受容体である CRP をコードする遺伝子の過剰発現が抗生物質の生産量を増大させた研究例[100] や CRP をコードする遺伝子の破壊が *S.coelicolor* における抗生物質生産を停止させた研究例[101] が報告されている．cAMP の *S.coelicolor* の表現型への影響に関する情報は未だ限られているものの，cAMP は他の二次メッセンジャーである c-di-GMP や c-di-AMP と合わせて，*S. coelicolor* における菌糸体の成長や抗生物質生産における重要性が既に示されている[102]．また上記の研究において，*S. coelicolor* は培地中に cAMP を放出することで，細胞内 cAMP の量の調節を行っていることが明らかになっており，これは第二章で得られた知見とも一致する．

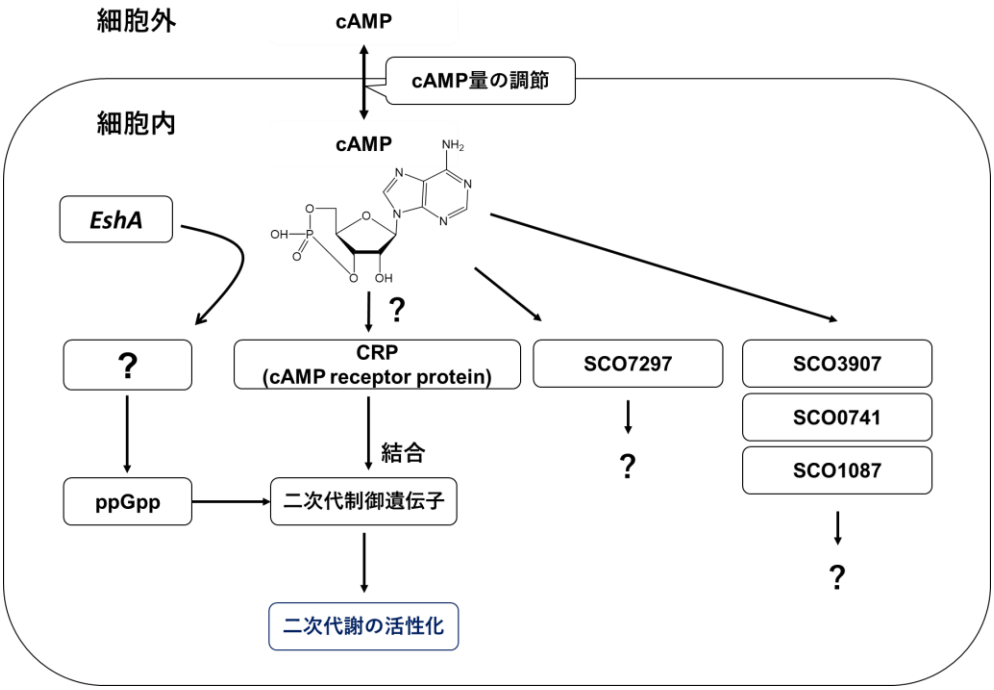


図 3-1 cAMP による *S.coelicolor* における制御機構

S. coelicolor における cAMP の作用機序に関していくつか研究例が報告されており，図 3-1 に *S. coelicolor* における既知の作用機序の概略を示す．cAMP が何等かの形で *eshA* 遺伝子と結合することで抗生物質制御遺伝子の活性化に必要な ppGpp 合成を関節的に制御している例 [103] や，何等かの形で CRP と結合することで直接的に抗生物質制御遺伝子を制御しているという例 [100] が報告されている．また，cAMP に反応する senser kinase[104] が同定されていることに加えて，cAMP が CRP と結合することで各種遺伝子 SCO3907 (single-strand DNA binding protein), SCO0741 (putative oxidoreductase), SCO1087 (putative aldolase)と結合すること [101] がわかっている．しかしながら，上記の知見から，cAMP は非常に複雑な制御を介して，形態分化や抗生物質生産を制御していることが推察され，制御因子としての作用機序の更なる解明が求められている．よって本章では，cAMP を培養培地へ添加した際の *S. coelicolor* の表現型の変化を特定すると共に，cAMP を培養培地へ添加した際のメタボローム解析・トランスクリプトーム解析によるオミクス解析を行うことで，cAMP 量の増大による代謝物量・遺伝子発現への影響を特定し， cAMP の抗生物質生産制御機構における作用機序の解明を試みた．

3.2　実験材料および実験方法

3.2.1 LC-MS/MS 分析に使用した試薬

2.2.1 と同様

3.2.2 *Streptomyces coelicolor* の培養条件

2.2.2 と同様

3.2.3 菌体および培養液サンプルの回収

2.2.3 と同様

3.2.4 アクチノロージンの定量

2.2.4 と同様

3.2.5 メタボローム解析に向けた前処理

2.2.5 と同様

3.2.6 LC-QqQ MS による代謝物の相対定量およびその統計解析

2.2.6 と同様

3.2.7 抗生物質の酢酸エチルによる抽出

培養開始 72 時間後の培地 20 ml に対して，等量の酢酸エチルを加え，よく混合したサンプルを遠心分離 (10000 rpm, 10 分, 4°C) にかけ，二層分離を行い，上清 15 ml を遠心濃縮および凍結乾燥に供した. 凍結乾燥後サンプルは分析まで-80°C で保管した.

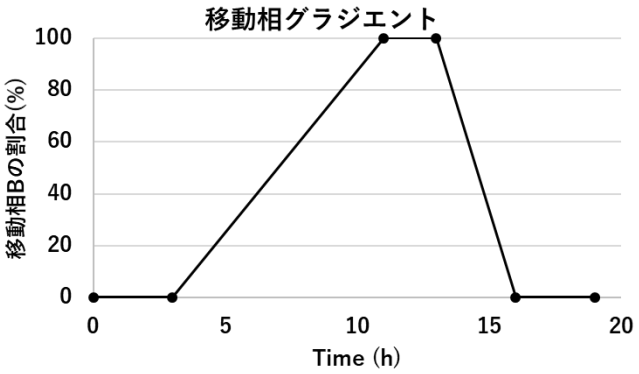
3.2.8 LC-Q-TOF MS による抗生物質の分析

乾燥サンプルに対して，200 µl の超純水を加えた後，移動相で 5 倍希釈した.

それらを下記の分析条件にて分析を行った.

クロマトグラフィー条件

LC ポンプシステム：Nexera XR (Shimadzu)
カラム：Inert Sustain AQ-C18 (2.1×150 mm, 3 μm, GL science)
移動相：A 0.1% (v/v) ギ酸添加超純水，B アセトニトリル
カラムオーブン温度：40 °C
移動相グラジエント：下記に示す



質量分析計条件

質量分析計：Q-TOF MS 9030 (Shimadzu)
分析モード：スキャン
スキャン *m/z* 範囲：50-300
イオン化モード：ポジティブイオン化モード
イオン化法：DUIS (ESI + APCI)
DL 温度：250 °C
インターフェース温度：300 °C
ヒートブロック温度：250 °C
ネブライザーガス流速：2.0 L/min
ドライイングガス流速：10 L/min
ヒーティングガス流速：10 L/min

ピーク同定およびその代謝物アノテーションは，LC-MS/MS を用いて抗生物質の分析を行った二例 [105] [106] の先行研究において観測された各化合物の MS/MS スペクトラム，および各化合物の理論精密質量値を基に行われた.

3.2.9 RNA の抽出・精製および品質確認

2.2.9 と同様

3.2.10 rRNA 除去，cDNA ライブラリーの作成およびシークエンシング(RNAseq)

本章で行った M145 株および M1146 株に cAMP を添加した際の RNAseq 解析は，精製した RNA 試料からの rRNA の除去, cDNA ライブラリーの作成およびそのシークエンシングを含めて，それぞれ Vertis 社 (Germany) および Genewiz 社 (China) に委託した．Vertis 社によって構築された cDNA ライブラリーは Illumina 社の NextSeq 5000 System によって，シークエンス長 75 bp で，総リード数 1×10M になるようにシングルエンドシークエンシングが行われた．Genewiz 社によって構築された cDNA ライブラリーは Illumina 社の HiSeq X-ten system によって，シークエンス長 150 bp で，総リード数が 2×10 M になるようにペアエンドシークエンシングが行われた.

3.2.11 RNAseq 生データのマッピング処理およびリードカウント

2.2.11 と同様

3.2.12 cAMP の添加

本試験系では，cAMP は培養開始後 48 時間後の M145 に対して，また培養開始後 20 時間後の M1146 に対して，それぞれ培地中で終濃度が 3 μM および 10 μM になるように添加した．また，3.2.13 で示される阻害剤添加の際にも同様に終濃度が 10 μM になるように添加した.

3.2.13 7-methylguanine および 7-methylguanosine の添加

7-methylguanine および 7-methylguanosine は培養開始 20 時間後の M1146 に対して，培地中で終濃度が 20 μM になるように添加した.

3.3 結果と考察

3.3.1 *Streptomyces coelicolor* への cAMP の添加による表現型の変化

S.coelicolor 株への cAMP 添加の影響を特定するため，M1146 株および M1146+ACT 株に cAMP を添加した際の菌体増殖量およびアクチノロージンの生産量を確認した．結果として，菌体増殖量は最終培養期 72h において平均で約 1.20 倍 (M1146) および約 1.22 倍 (M1146+ACT) に増大した (図 3-2).

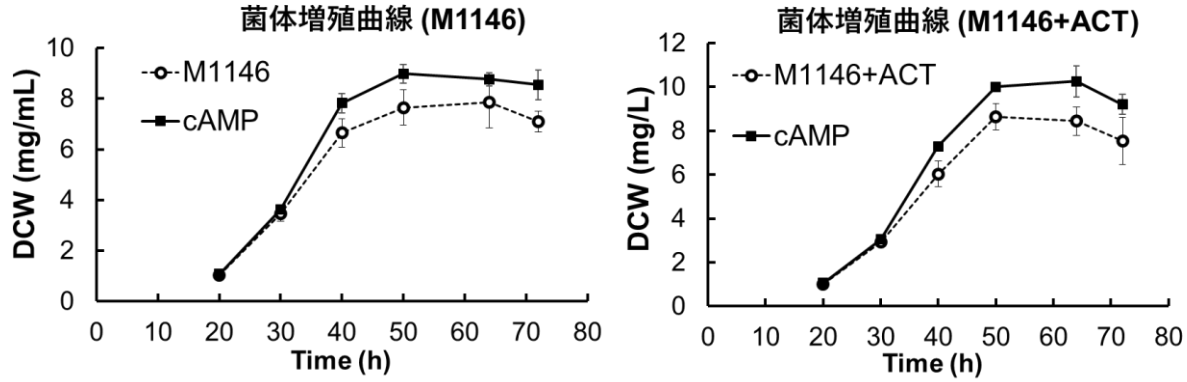


図 3-2 cAMP 添加による菌体量の変化 (M1146 株および M1146+ACT 株) (N=3)

細胞外のアクチノロージン生産量に変化は観測されなかったが，細胞内のアクチノロージン量が約 1.48 倍に増大し，培養液 50 mL あたりの細胞外および細胞内を統合させた総アクチノロージン生産量が平均で約 1.10 倍に増大した(図 3-3).

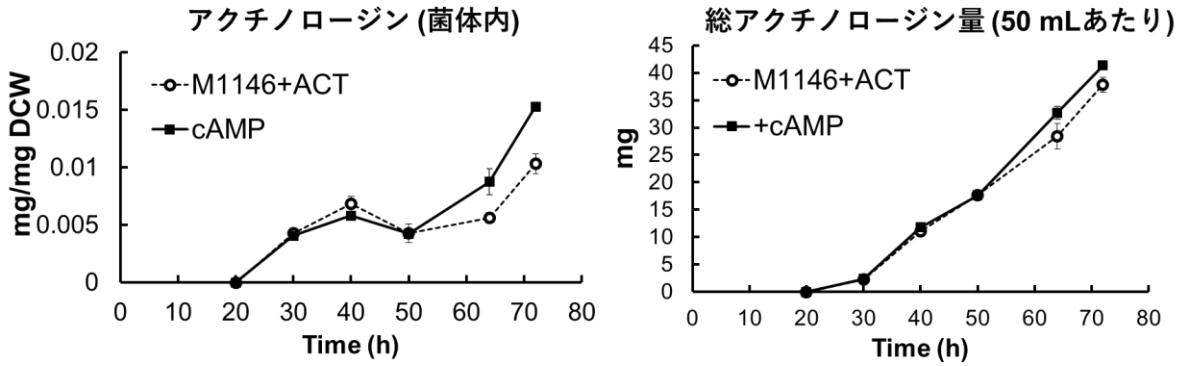


図 3-3 cAMP 添加によるアクチノロージン生産量の変化 (N=3)

ここで，cAMP の添加によって生産開始時期の早期化は観測されなかったが，第二章で意図した抗生物質の生産増加に資する代謝物の特定は達成された結果となった.

また，添加した cAMP が菌体内へと取り込まれていることを証明するため，培養培地に cAMP を添加した際の細胞外 cAMP 量および細胞内 cAMP 量を測定した．結果を以下にて示す．

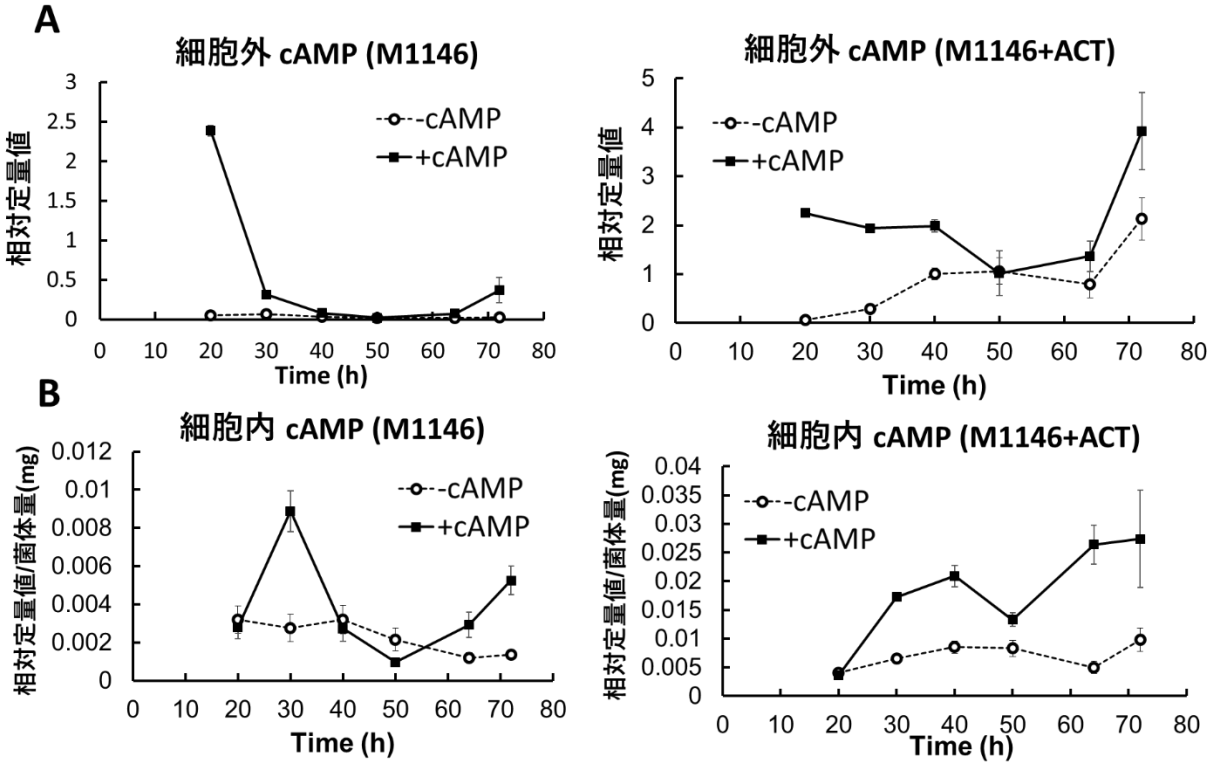


図 3-4 cAMP 添加後における細胞内および細胞外 cAMP 量の変化
(A)：M1146, M1146+ACT 株に cAMP を添加した際の細胞外 cAMP 量の変化 (N=3)
(B)：M1146, M1146+ACT 株に cAMP を添加した際の細胞内 cAMP 量の変化 (N=3)

以上に示すように，M1146 株および M1146+ACT 株の両株において培地に添加された cAMP が減少しており，細胞内の cAMP 量も向上していることがわかる (図 3-4)．よって，添加された cAMP は菌体に取り込まれていることが示された．また興味深いことに培養開始後 72h において，細胞外および細胞内の cAMP 量が cAMP 添加試料において再度上昇していることが示され，cAMP を添加した試料において，より多くの cAMP 量が観測された (図 3-4)．これは上記で観測した M1146+ACT 株におけるアクチノロージン量と cAMP 量間の相関関係と整合性の取れた結果となった．興味深いことにアクチノロージンを生産しない M1146 株においても cAMP 量の上昇が観測され

ており，これは cAMP の添加によって，M1146 株においてアクチノロージン以外の抗生物質の合成量を向上させているのではないかという仮説を提唱した．

そこで，cAMP の他の抗生物質の生産量への影響を確認するため，アクチノロージンを生産しない M1146 の培養培地に cAMP を添加した際の培養定常期 (72h) における培養液から，二次代謝物を酢酸エチルによって抽出し，LC-MS による分析を試みた．ここでは過去の研究で *S. coelicolo*r の培養培地中において観測された抗生物質の生産量の変化を観測することを試みた．しかしながら，それらの抗生物質は標準物質が入手不可能なものもあり，標準物質の前測定による RT 情報および MRM 情報の取得は不可能であった．そこで本研究では精密質量および MS/MS スペクトラムを取得可能な LC-Q-TOF MS を使用することで，検出される代謝物ピークの精密質量および MS/MS スペクトラムから，それら抗生物質の分析を目指した．

酢酸エチルによって培地中の抗生物質を抽出し，試料のアセトニトリルによる希釈系列を LC-Q-TOF MS を用いた分析に供した際に，以下の三条件に適合する代謝物のみを信頼度の高い同定結果とした．

①：希釈系列におけるピークエリア値の変化が，その希釈系列に従う．

②：理論の精密質量値との誤差が 10 ppm 以内．

③：MS/MS スペクトラムが過去の研究で得られたものと同様の結果を示す．

以上の３条件を全て満たした抗生物質として，Germicidin A (質量誤差：3.5 ppm) および Germicidin B (質量誤差：4.0 ppm) が挙げられた (図 3-5)．以下にそれらのクロマトグラムおよびそのピークエリア値による比較を示す．ピークエリア値による比較において，cAMP を添加した培地では，2 種の Germicidin の生産量が有意 (p-value < 0.01) に増大したことから，cAMP は *S. coelicolor* における Germicidin の生産量を向上可能であることが示された．また，その際の MS/MS スペクトラムは以下の通りであり，過去の研究 [105] で観測された MS/MS スペクトラムと同様の結果を示した (図 3-6).

また Germicidin B と Germicidin A の質量差は整数質量で 14 であり，赤色で示した質量電荷比も各菌株間で同様に整数質量で 14 の差を示すことから Germicidin のアノテーションの妥当性が示唆された.

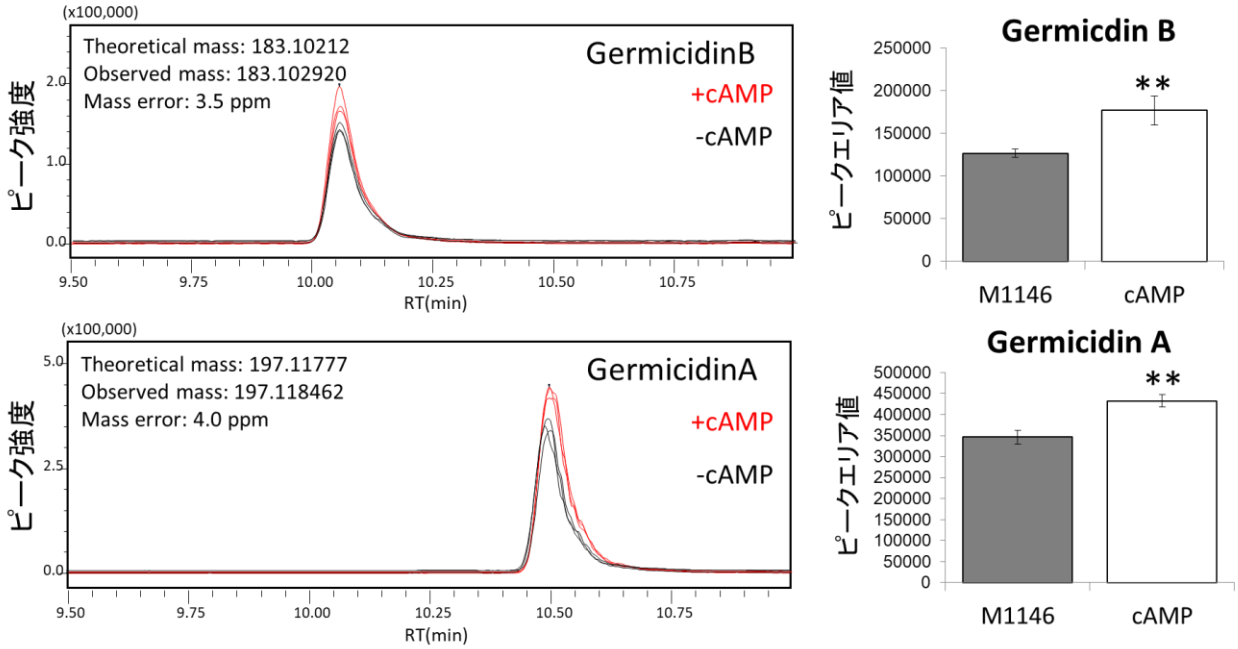


図 3-5　cAMP を添加した際の Germicidin A および Germidin B の量変化 (N=3)
クロマトグラムおよびピークエリア値による比較を示す (**p-value < 0.01)

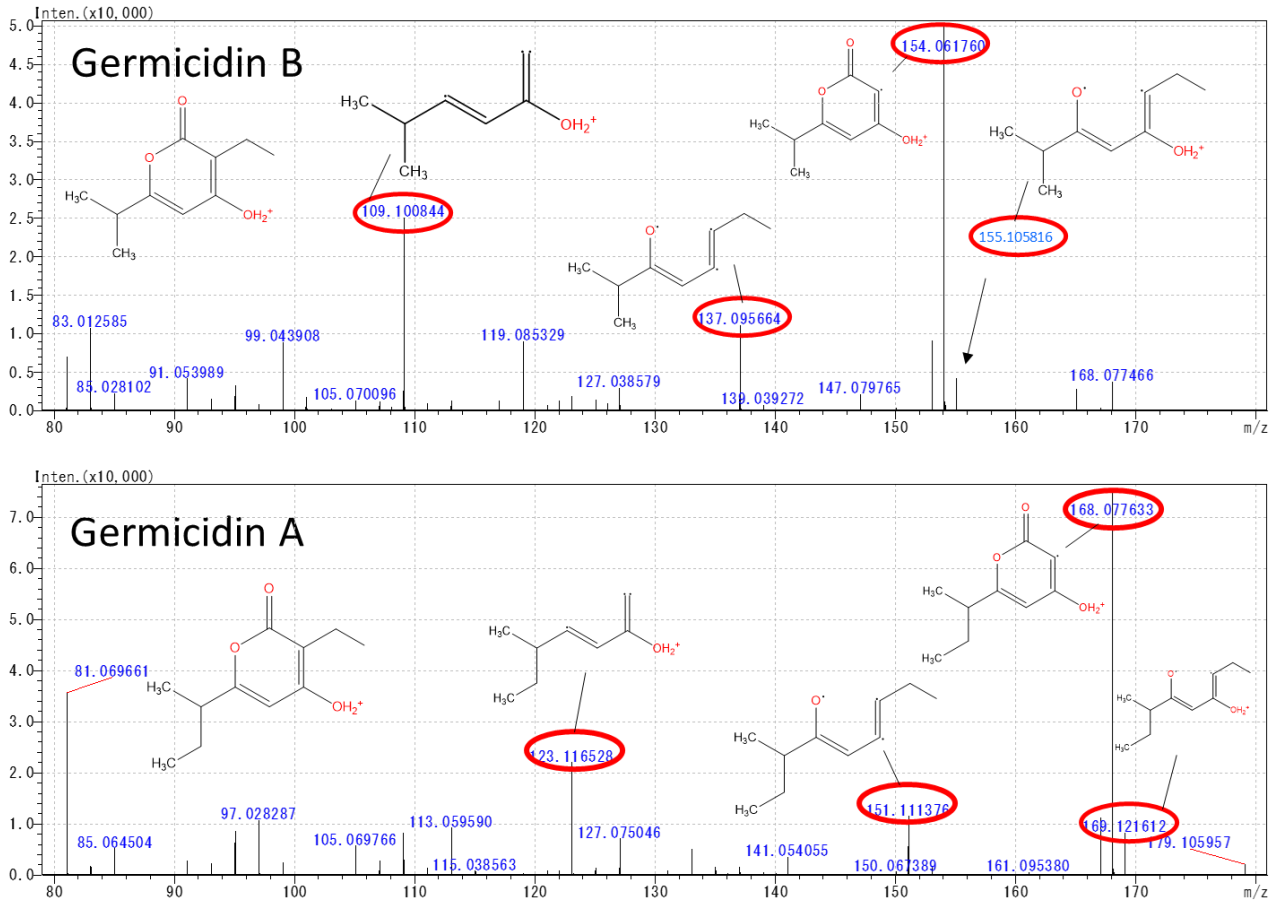


図 3-6　Germicidin A および Gerimicidin B 候補ピークの MS/MS スペクトラム

赤色で囲まれた質量電荷比が先行研究[105]における MS/MS 解析によって観測された質量電荷比を示す.

3.3.2 *Streptomyces coelicolor* における cAMP の添加によるアクチノロージン合成遺伝子発現量変化

cAMP 添加による抗生物質生産遺伝子の発現量への影響を確認するため，培養開始後 48h における M145 株に対して，cAMP を添加した 2 時間後の試料における遺伝子発現量を RNAseq 解析によって特定した．RNAseq 解析において得られたリードカウントに対して，FDR が 5%以下および Log2 Fold-change が 0.5 以上になるものを DEG として選定し，選抜された DEG のリストを補助資料 図表 S14 に示す．結果的にアクチノロージン合成遺伝子クラスターのうち 2 遺伝子 (SCO5085 および SCO5086) が有意な差を持つ DEG として同定された (図 3-7). そのうち，SCO5085 はアクチノロージンの SARP (代謝経路特異的制御酵素) である ACTⅡ-ORF4 をコードする．アクチノロージンの合成は培地成分が枯渇した定常期において ACTⅡ-ORF4 が発現し，アクチノロージンの合成が開始されることが明らかになっている [38]．本結果から，遺伝子発現レベルにおいてもアクチノロージンの合成が強化されることが示された．

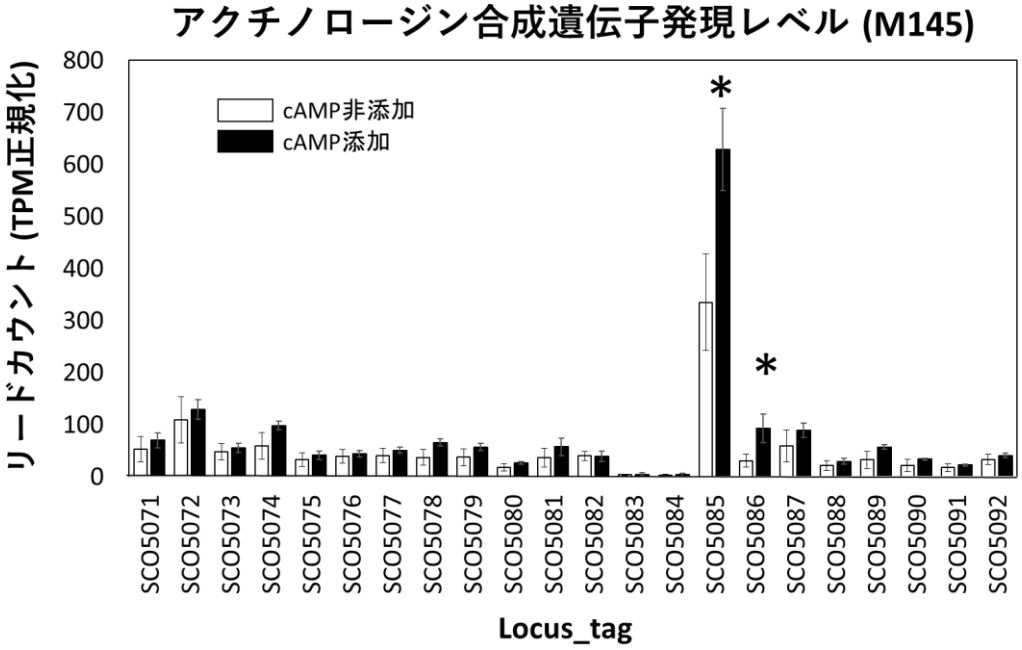


図 3-7 cAMP 添加後におけるアクチノロージン合成遺伝子の発現レベルの変化 (N=3)
白色が cAMP 非添加サンプル，黒色が cAMP 添加サンプルを示す．*：DEG を示す．

3.3.3 アクチノロージンの生産株／非生産株への cAMP の添加によるメタボロームへの影響

3.3.1 および 3.3.2 で得られた結果から，cAMP が M1146+ACT 株においてアクチノロージン合成を，M1146 株において Germicidin A および Germicidin B の合成を強化することが示された. また両株において菌体量を有意に向上させることも同時に示された. ここで cAMP がそれらの表現型を *S. coelicolor* において向上させる正の制御機構の作用機序を解明するための仮説を提唱するため，cAMP の添加によって表現型の向上を示した菌株 M1146 株ならびに M1146+ACT 株の培養培地に対して cAMP を添加し，その後の各増殖段階におけるメタボロームへの影響をの特定を試みた．下記に各株における各代謝物への cAMP の影響をヒートマップ解析によって示す (図 3-9)．また，その際，cAMP を添加していない試料における代謝物量に対する cAMP を添加した試料における代謝物量の比を FC にて算出し，FC によるヒートマップ解析を行った.

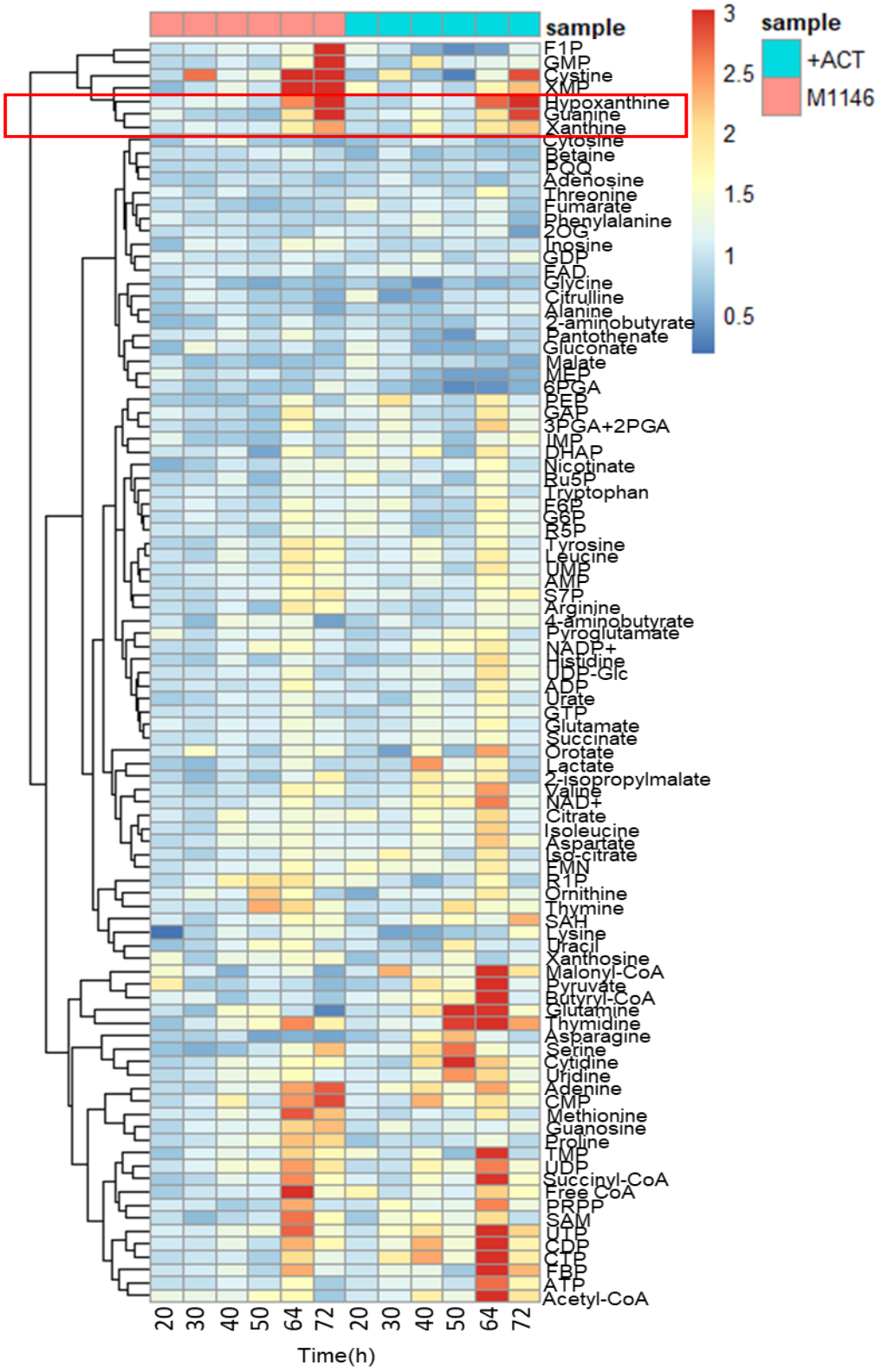


図 3-8 *S.coelicolor* における cAMP 添加による細胞内メタボロームへの影響解析

cAMP を添加していない試料における代謝物量の平均値 (N=3)に対する cAMP を添加した試料における代謝物量の平均値 (N=3)の FC を HCA でクラスタリングしたものをヒートマップにて示す．sample は赤色：M1146 株，青色：M1146+ACT 株を示す．

ここで重要代謝物の候補同定の擬陽性を削除するため，M1146 および M1146+ACT の両株で同様の変化を示す代謝物のみを重要代謝物の候補として特定した.

結果として，M1146 および M1146+ACT の両株において，キサンチン，グアニンおよびヒポキサンチンの量の増加が培養後期 (64h, 72h) において見られた (図 3-9).

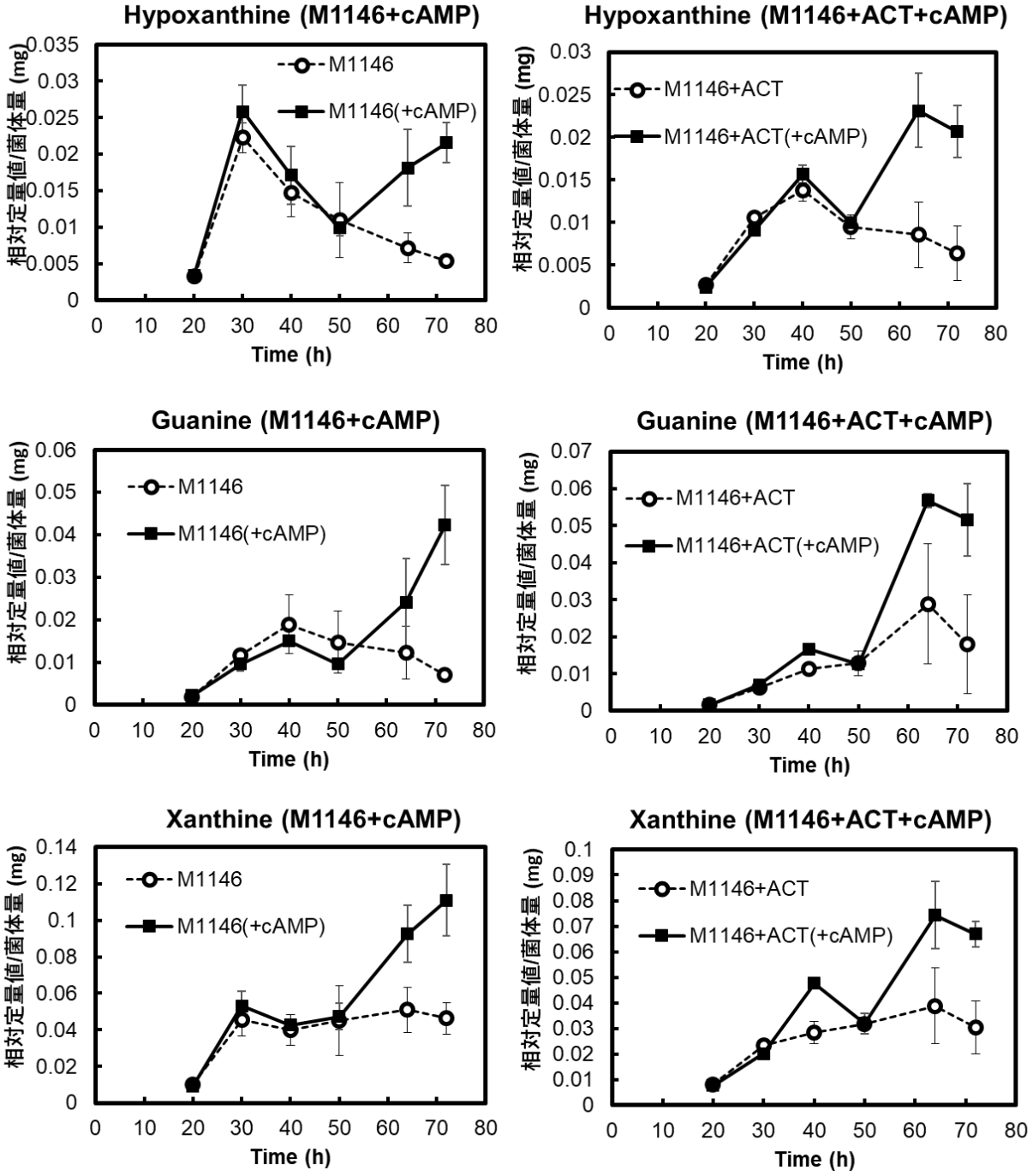


図 3-9 cAMP 添加による Hypoxanthine, Guanine および Xanthine の量変化 (N=3)

3.3.4 アクチノロージンの非生産株への cAMP の添加によるトランスクリプトームへの影響

3.3.3 で選定されたキサンチン，グアニンおよびヒポキサンチンは全てプリン塩基に分類される．そのため，それらに関連する遺伝子の発現レベルが大きく変わっているのではないかという仮説を立てた．そこで本仮説を立証するため，cAMP を培養培地に添加した際の RNAseq 解析によるトランスクリプトーム解析を行った．第二章において，アクチノロージンを多く生産する菌株では，アクチノロージンによる酸化ストレスが *S. coelicolor* のトランスクリプトームに大きく影響を与えることが示されたことを考慮し, その影響を除外するため, cAMP をアクチノロージン非生産株である M1146 株に添加した際のトランスクリプトーム解析を実施した．cAMP の添加後，0 時間後，1 時間後，2 時間後に菌体試料を回収し，それら菌体から抽出および精製した RNA 試料を用いて RNAseq 解析を行った．それらの DEG 数をベン図によって示したものが下図 3-10 である．本解析から得られた DEG を補助資料 図表 S15 にて示す． 本結果より 0h から 2h が全体の発現変動を良く表していることが示された．

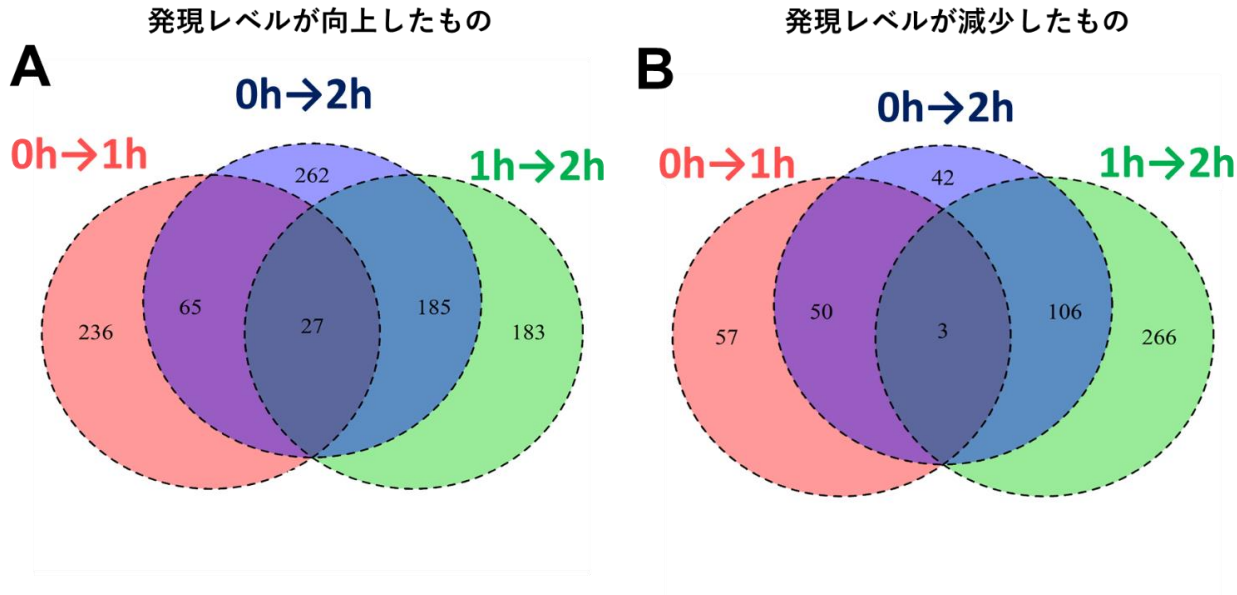


図 3-10　ベン図による cAMP 添加の際のトランクリプトーム解析における発現変動遺伝子数の評価 (M1146 株)

ここで，発現レベルが向上した遺伝子群に対して GSEA 解析結果を下図 3-11 に示す.

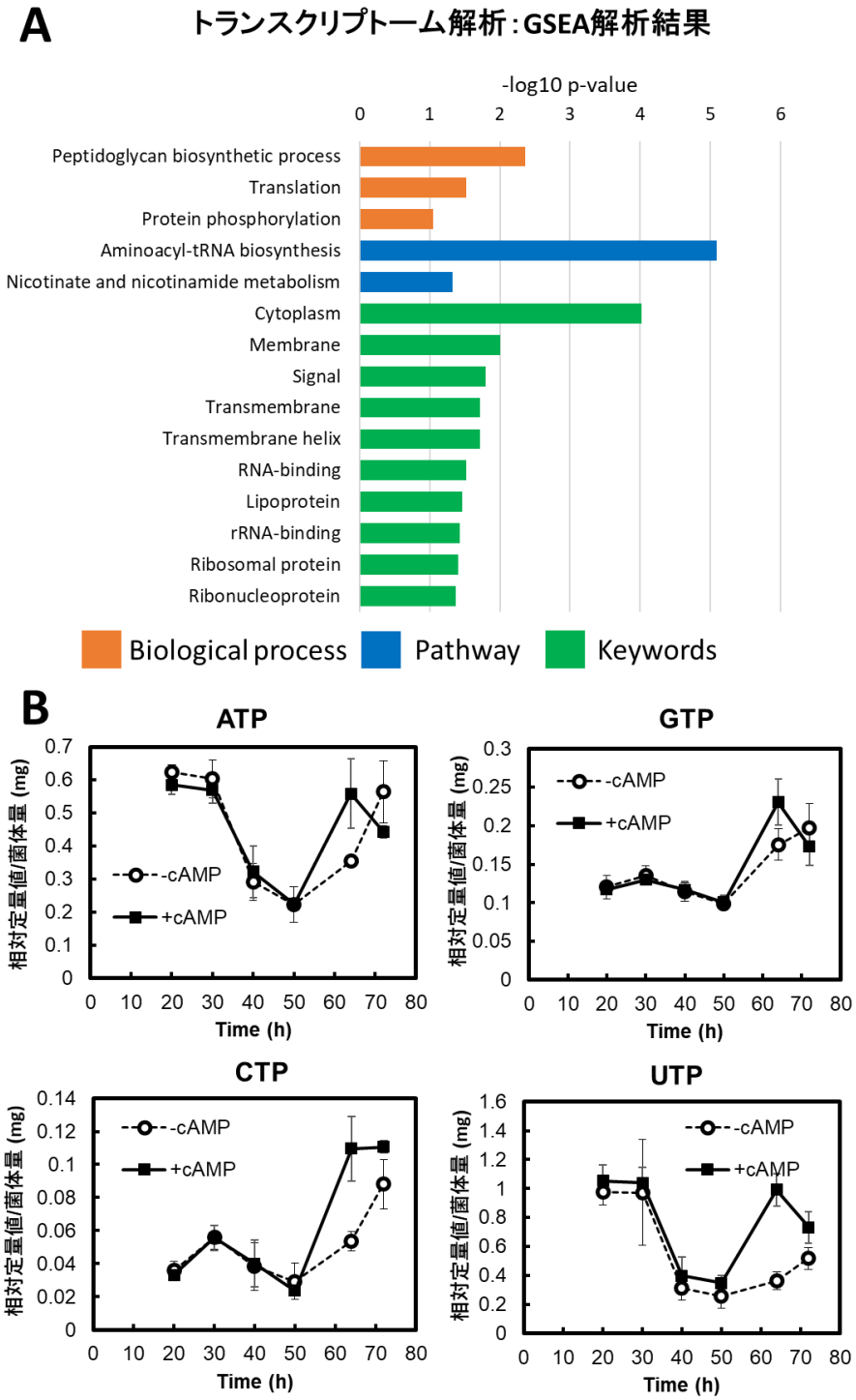


図 3-11 cAMP を M1146 株に添加した際の発現向上遺伝子に対する GSEA 解析結果

(A) GSEA 解析結果．オレンジ色が Biological process (生体プロセス)，青色が Pathway (代謝経路)，緑色が Keywords (キーワード)を示す.

(B) cAMP 添加によるヌクレオチド三リン酸および SAM の量変化 (M1146 株)

それぞれの遺伝子群に属する遺伝子を補助資料 S16 に示す．tRNA 合成遺伝子の発現量向上などの RNA に関連した遺伝子群において有意に発現レベルが向上していることがわかる．本結果は RNA の前駆体であるヌクレオチド三リン酸の量増加とも一致する知見となった (図 3-11B)．本知見に基づき rRNA および rRNA に関連する遺伝子発現レベルを確認すると，rRNA 合成酵素ならびに rRNA メチル化酵素をコードする遺伝子の発現レベルの向上も同様に観測された (図 3-12)．またここでメチル基供与物質である SAM (S-アデノシルメチオニン) 量の向上も観測された．特に SAM は作用機序が明らかになっていないものの抗生物質生産の誘導物質であることが知られているが [32]，ヌクレオチド三リン酸や SAM の量変化は図 3-9 で示したプリン塩基の量変化と比較すると微量であった．

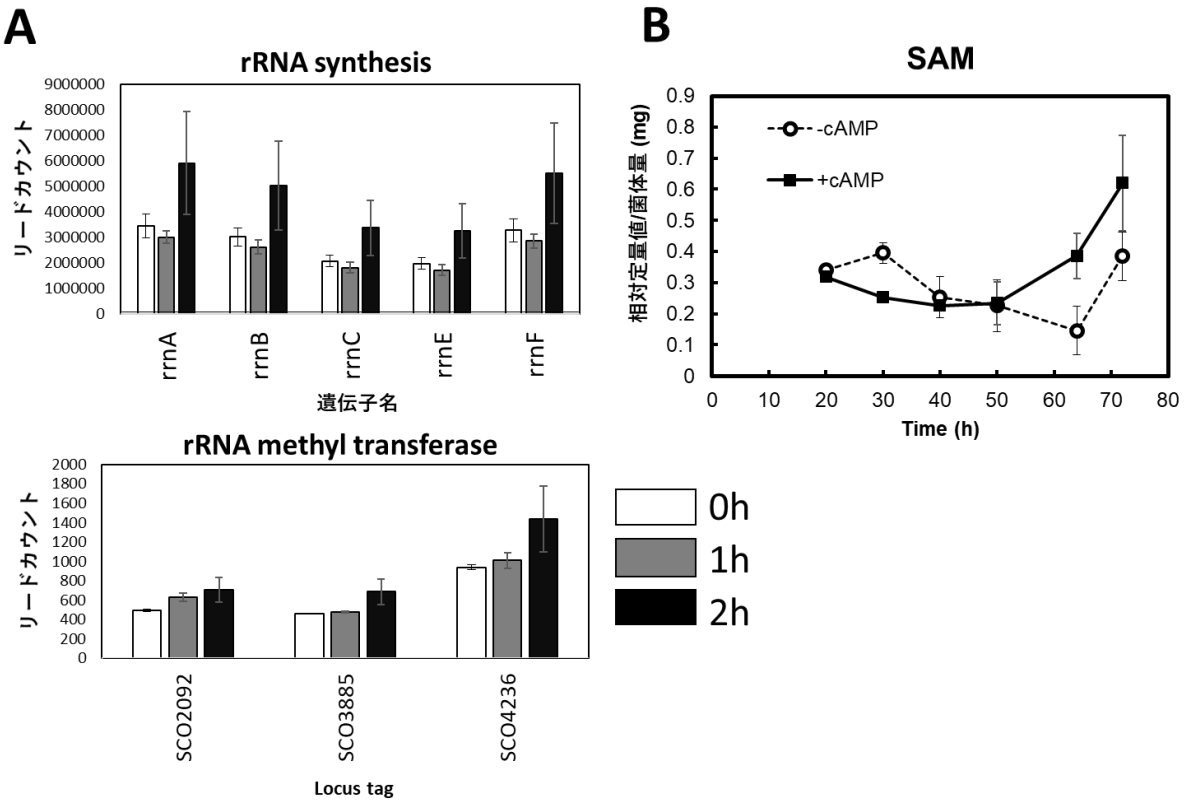


図 3-12 cAMP 添加による rRNA 関連酵素をコードする遺伝子の発現レベルの変化および SAM 量の変化 (M1146 株)

(A) cAMP 添加による rRNA 合成酵素, rRNA メチル化酵素をコードする遺伝子の発現レベルの変化．リードカウントは RLE 正規化によって正規化されている (N=3).

(B) cAMP 添加による SAM 量の変化

ここで，3.3.3 の cAMP を添加した際のメタボローム解析において，プリン塩基量の増大が M1146, M1146+ACT 株の両株で増大が観測されたことに着目し，本 RNAseq 解析では，プリン塩基の合成に関わる遺伝子の発現変化に着目した．以下に cAMP を添加した際のメタボローム解析結果とトランスクリプトーム解析結果をプリン塩基に関連する代謝経路上にヒートマップ解析結果の形で示した (図 3-13).

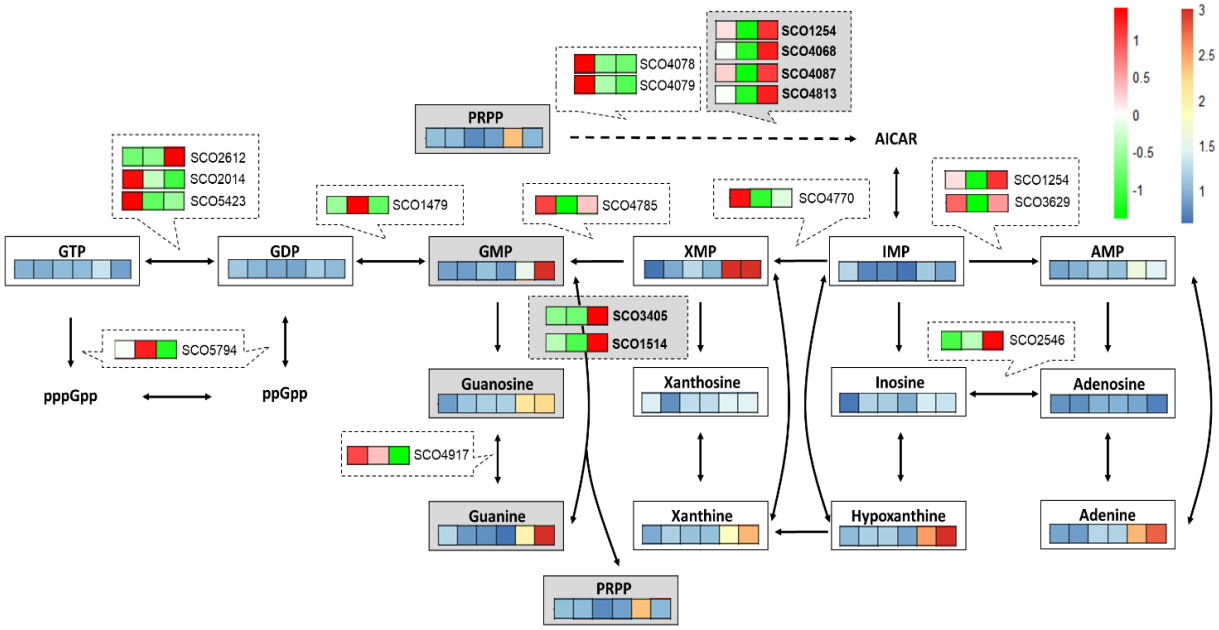


図 3-13 cAMP 添加後のプリン塩基代謝における代謝物量および遺伝子発現量の変化
灰色の背景で囲まれているものが有意な遺伝子発現量の変化 (FDR < 5%, Log2FC > 0.5) を示したものである．遺伝子発現量は左から cAMP 添加後 0h, 1h, 2h を示しており，各時間における値をオートスケーリングで正規化したものを緑色から赤色のスケールで示す．代謝物は左から cAMP 添加後，20h, 30h, 40h, 50h, 64h,72h を示しており，添加したサンプルと添加していないサンプル間における各時間での cAMP を添加していない試料と添加した試料における代謝物量値の FC 値を青色から赤色のスケールで示す．

興味深いことに PRPP からプリン塩基の前駆体である AICAR (5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボチド) を合成する遺伝子の多くは有意に発現レベルの増大を示した．これは上記のメタボローム解析におけるグアニンなどのプリン塩基の増大と一貫している．またプリン塩基をサルベージ経路によって回収し，プリンヌクレオチドを合成する遺伝子の発現量も増大しており，これは M1146 株に cAMP を添加した際の GMP, XMP 量の増大とも一貫している．ここでグアニン量がより顕著に増大していることに着目し，上記で述べた重要候補代謝物の中でもグアニン量の増大およびグアニンを使用する反応が cAMP の正の制御機構において重要なのではないかという仮説を提唱した．

3.3.5 阻害剤 7-methylguanine および 7-methylguanosine の添加, および本試験系への cAMP の添加

3.3.4 で，グアニンの量およびグアニンに関連する反応が cAMP の *S.coelicolor* への正の効果に重要な役割を果たしているのではないかという仮説を提唱した．そこで，グアニンを使用する反応を競合阻害で阻害する 7-methylguanine [107] [108] を添加した培地に cAMP を同時に添加することでグアニンに関連する経路の重要性を示すことを目指した. また同時に，グアノシンに関連する反応を競合阻害で阻害する 7-methylguanosine [109] を添加した培地に cAMP を同時に添加することで，cAMP の作用のコントロール実験を構築した．興味深いことに，7-methylguanosine によって阻害された菌体量およびアクチノロージンの生産量は cAMP の添加によって再生されたのに対して(図 3-14B,C)，7-methylguanine によって阻害された菌体量およびアクチノロージンの生産量は cAMP の添加によって再生されなかった (図 3-14A,C)．またグアニン量も同様に確認し，7-methylguanosine 添加培地では減少したグアニン量が cAMP によって再生されたのに対して，7-methylguanine 添加培地では減少したグアニン量が cAMP によって再生されなかった (図 3-14D)．本結果より，グアニンを使用する経路が cAMP 添加の影響の下流に存在しており，グアニン量の増加およびグアニンを使用する経路が cAMP の正の効果の作用機序において重要であることが示された.

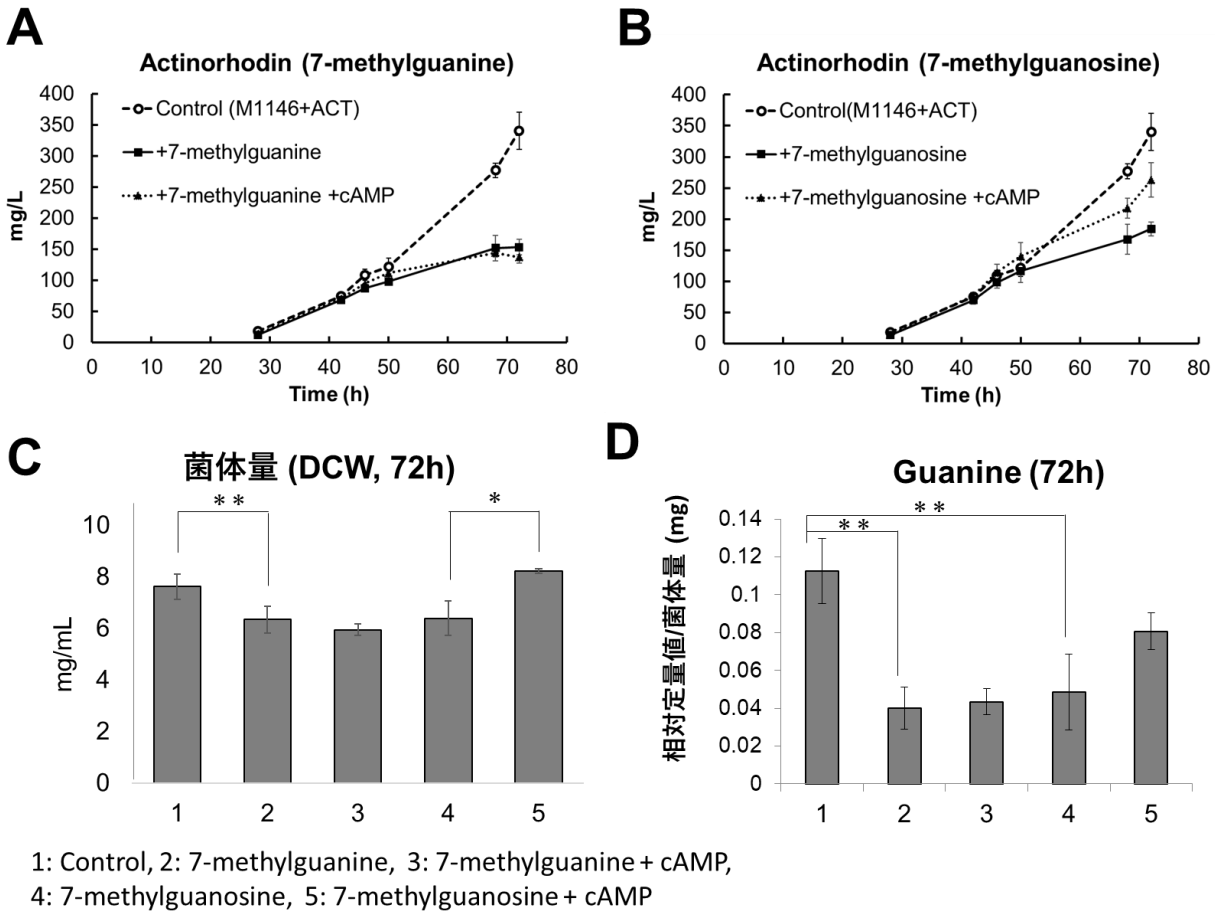


図 3-14 阻害剤の添加および cAMP 添加による阻害の補完結果

(A)：M1146+ACT 株に 7-metylguanine および cAMP を添加した際のアクチノロージン生産量 (N=3)

(B)：M1146+ACT 株に 7-metylguanosine および cAMP を添加した際のアクチノロージン生産量 (N=3)

(C)：M1146+ACT 株に 7-methylguanine, 7-methylguanosine および cAMP を添加した際の菌体量比較 (N=3). 培養開始後 72 時間後のデータを示す. *p-value < 0.05, **p-value < 0.01 : Tukey's test.

(D)：M1146+ACT 株に 7-methylguanine, 7-methylguanosine および cAMP を添加した際の Guanine 量比較 (N=3) 培養開始後 72 時間後のデータを示す. **p-value < 0.01 : Tukey's test.

3.4 小括

本章では，cAMP を添加した際の *S. coelicolor* における菌体量および抗生物質生産量などの表現型の変化の解析を行った．結果として，cAMP の培養培地への添加は *S. coelicolor* における菌体量増殖，*act Ⅱ-ORF4* 遺伝子発現量の向上，アクチノロージン生産量の向上および Germicidin 生産量の向上に寄与していることが示された．

また cAMP 添加時のメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析を用いることで，cAMP の代謝物量および遺伝子発現レベルへの影響を特定し，cAMP の作用機序の解明を試みた．cAMP の添加は代謝物レベルにおいて，グアニンなどのプリン塩基量の増大を示し，さらに遺伝子発現レベルにおいて，プリン塩基の合成経路遺伝子の発現量増大やサルベージ経路によるプリンヌクレオチドの合成遺伝子の発現量の増大が観測された．代謝物量情報および遺伝子発現情報を統合した結果から，cAMP の正の制御機構における作用機序においてグアニンの重要性を提唱し，その重要性を阻害剤の添加および cAMP の添加によるその阻害効果の補完によって，グアニンおよびグアニンを使用する経路が cAMP の正の影響の下流に存在しており，本作用機序に重要であることが示された (図 3-15)

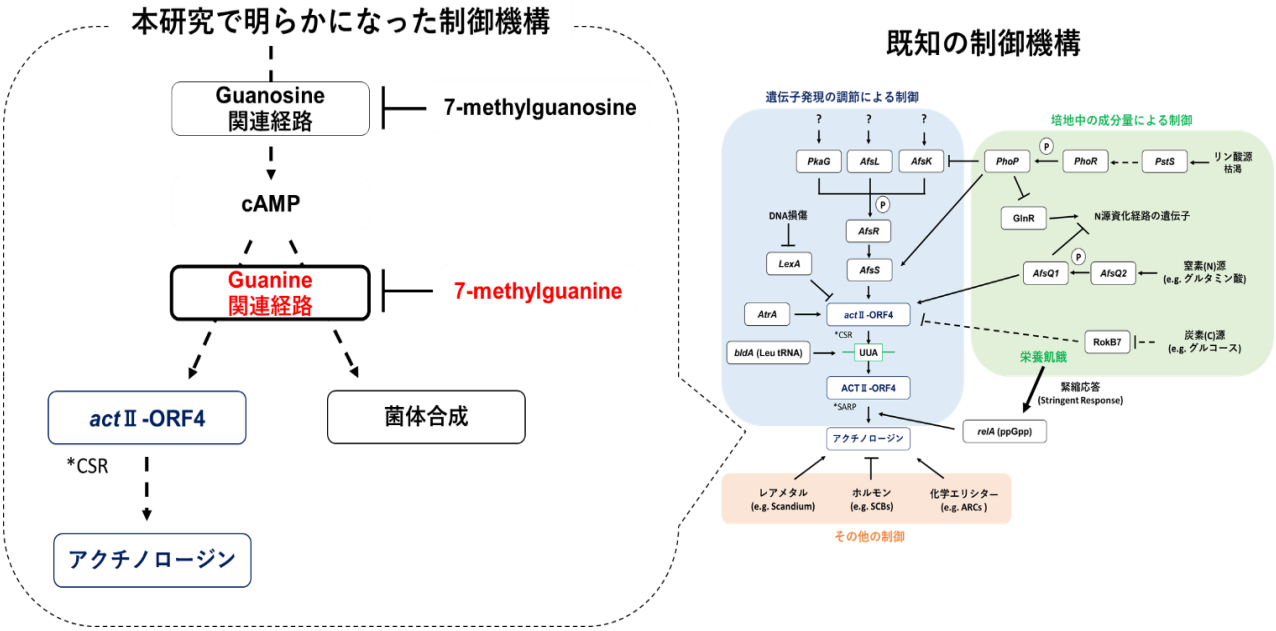


図 3-15 本研究によって新たに明らかになったアクチノロージン生産制御機構

第四章　総括

本博士論文研究は，メタボローム解析を基盤としたオミクス解析を採用することで，*S. coelicolor* における抗生物質生産に寄与する代謝物の特定およびその作用機序の部分的な解明を行った研究である．また本研究は代謝物量の変化につながる各反応を触媒する酵素をコードする遺伝子の発現量を特定可能なトランスクリプトーム解析をメタボローム解析結果に対して統合することで，より詳細な解析を試みた研究である．第一章において本研究はメタボローム解析によって「抗生物質生産に資する刺激物質の探索」および「抗生物質生産における前駆体合成に寄与する知見の特定」を試みると共に，トランスクリプトーム解析によって「特定した刺激物質の各種制御遺伝子の発現量への影響の特定」を試みることを目指した．下記の図 4-1 にその結果を示す．

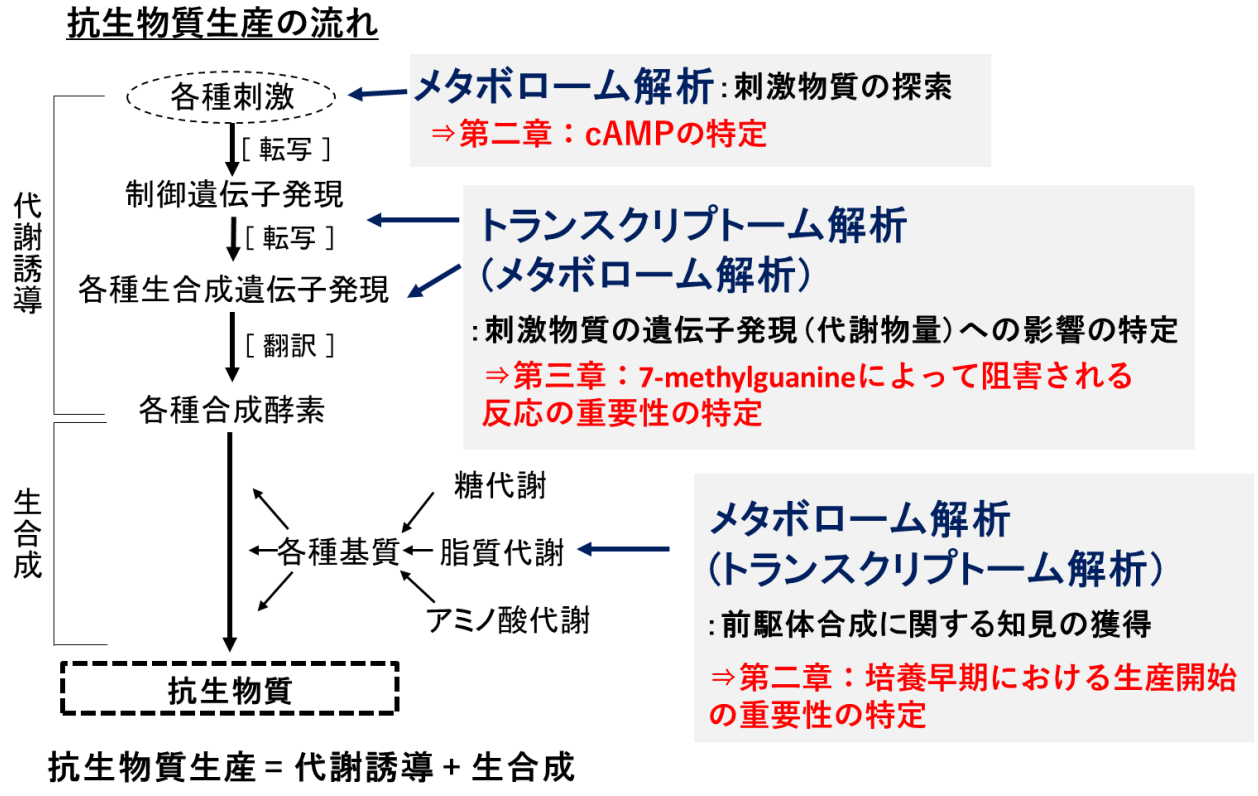


図 4-1 本研究における結果の詳細

第二章では， *S. coelicolor* の異なる培養段階における主要な代謝物の変化を一次代謝物の絶対定量を用いて，遺伝子発現の変化を RNAseq によって特定した．結果的に抗生物質が生産される培養定常期における中央代謝の活性の低下が示され，本結果により抗生物質の生産開始時期が早まることで最終生産量の向上が達成される可能性が示唆された．本仮説を基にアクチノロージン生産を抗生物質生産のモデルケースとし，生合成遺伝子導入および *rpoB* 遺伝子への部分変異導入を用いることで，抗生物質生産の開始時期の早期化が，抗生物質の最終生産量の向上につながることを示した．また，本実験系で使用された抗生物質の生産開始時期および最終生産量の異なる *S.coelicolor* のメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析によるマルチオミクス解析によって，細胞内・細胞外における cAMP の量が抗生物質生産の時期および量と相関していることを示し, cAMP の *S. coelicolor* における抗生物質生産への重要性を提唱した.

第三章では, cAMP の培地添加による *S. coelicolor* の菌体量の増加および対象モデル抗生物質であるアクチノロージンの生産量増加が示された．またモデル抗生物質以外の抗生物質である Germicidin への一般性の特定が達成された．cAMP 添加試料のメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析によるマルチオミクス解析を用いることで，プリン塩基合成が cAMP 添加によって増強されていることが示され，そのうちグアニン量の増加およびグアニンを使用する反応が本知見の作用機序の一部を成している仮説が提唱された．本仮説を 7-methylguanosine の添加結果をコントロール実験としながら, 7-methylguanine による阻害および各阻害剤を添加した培養培地への cAMP の添加による阻害補完実験により，本仮説の立証を行った．結果的に，7-methylguanine によって阻害される反応が cAMP の影響の下流に存在していることが示され，cAMP による抗生物質生産の制御機構において重要な役割を担うことが示された.

今後の展望

本研究で得られた知見は，抗生物質生産における制御機構の理解の一端を広げることを可能にする知見である．本知見の作用機序の更なる理解によって，新規抗生物質の発見を可能にすることや抗生物質のより効率的な生産に資する知見が特定されることが期待される．しかしながら，本研究において達成されなかった課題点が三つあり，それらを以下の図 4-2 に記載し，順に詳細を記載する．

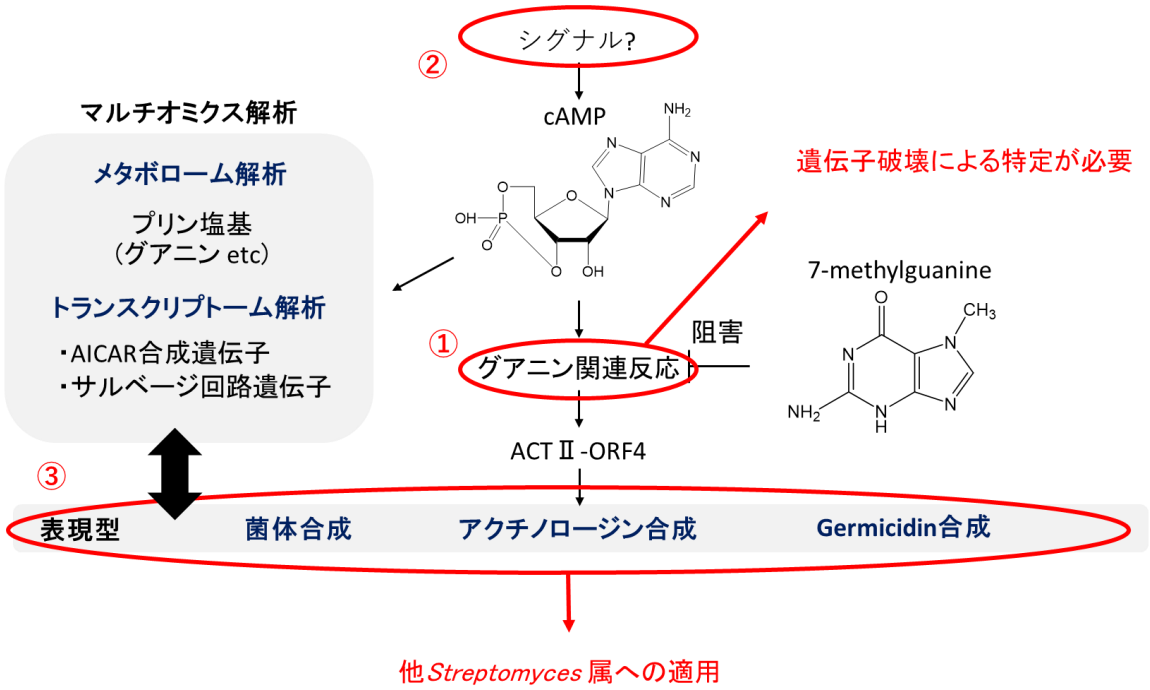


図 4-2 本研究において達成されなかった今後の課題点

本研究では明らかにされなかった鍵となるグアニン関連経路の特定が特に必要であると考えられる．グアニン量の変化から，グアニンを放出する反応が阻害されていることが示唆されており，今後は鍵となるグアニン放出反応の特定が求められる．また，cAMP を添加した際のトランスクリプトーム解析の結果から，プリン合成やサルベージ回路に関連する遺伝子の発現量向上が観測されており，本知見の制御機構の解明を含めて，より詳細な制御機構の解明が求められる．そのためには，特定の遺伝子をひとつずつ破壊し，その変異株における抗生物質生産量ならびに cAMP 添加の影響を特

定する必要があると考えられる．また cAMP を合成する酵素をコードする遺伝子の発現量の有意な向上は観測されておらず，cAMP 量の向上に寄与するメカニズムの解明に関しても，今後の課題点であると考えられる．

また本研究では，*S. coelicolor* を対象とした研究を行ったが，各種 *Streptomyces* 属はゲノム情報など類似した特性を有していることが知られており[110]，本研究で得られた知見が他の *Streptomyces* 属に対しても適用可能であることを確認することで，本研究で得られた知見が広く利用されることを確認することが求められる．

本研究は *S. coelicolor* に対してメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析によるオミクス解析を用いたシステマチックな解析を行った初の研究であり，*Streptomyces* 属におけるメタボローム解析を組み込んだオミクス解析研究において端緒を開く研究になることが期待される．

今後の研究においては，メタボローム解析を含めたオミクス解析が *Streptomyces* 属に対して適用されることで，今後において更なる新規制御メカニズムの解明ひいては新規抗生物質の探索ならびに抗生物質の効率的生産が達成されることを期待される．そこで以下に示すような留意点を含む 4 つの展望を述べる．

1. オミクス解析は緒言で述べた通り，多量データが取得可能である一方で，データ量の多さに起因することで，作業仮説を提唱する際に誤った重要候補因子を特定する可能が十分にある．そのため本研究で示したような，オミクス解析に基づく擬陽性の少ない仮説提唱を達成するために適した実験デザインを組むことが重要である．

2. メタボローム解析の分析可能範囲の拡大が今後において望まれる．本研究では事前に分析対象を設定し，標準物質を事前に分析することで擬陽性の少ない代謝物アノテーションを行うターゲット分析を採用した．その中で本研究では中央代謝 (解糖系，TCA 回路，ペントースリン酸回路)，アミノ酸，核酸塩基，ヌクレオシド，ヌクレオチド，補酵素，短鎖アシル CoA，一部のビタミンなどに対象を絞り分析を行うと共に，Q-TOF MS によって一部の二次代謝物の分析を行った．しかしながら，脂質代謝物質や二次代謝誘導に関連するオートレギュレーターの分析は行っておらず，今後は他のオミクス解析と同等の分析対象範囲の拡大が求められる．そうした現状において，分析対象を事前に設定しないノンターゲット解析が頻用されているが，未だ代謝物アノテーションにおいて擬陽性の高い手法であるため [111]，現状では複数のターゲット分析システムを採用する必要がある．今後の分析および解析技術の更なる発展を期待する．

3. 本研究では，メタボローム解析およびトランスクリプトーム解析を採用した結果，cAMP に重点を置いた議論を行ったが，本研究で獲得されたメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析を介したオミクス解析データの中に多くの有用情報が未だ内在していると考えられる．そのため，本データから更なる有用情報を捜索することは抗生物質制御機構の更なる理解のために重要であると予想される．

また図 4-1 に示したように本研究では，制御遺伝子の発現量の変化の下流に存在する各酵素の合成に関する情報を取得していない．そのため本情報を取得可能なプロテオーム解析の統合が更なる制御機構解明のための情報の取得に貢献可能であると予想される．例を挙げると，代謝物定量データはプロテオーム解析データと統合することでアロステリック制御などのタンパク質との相互作用を解析可能であることが示されている [112].

しかしながら，更なるオミクス解析データを取得することで問題点となってくるのは解析するデータ量が更に膨大になることであり，膨大なデータから生命現象を紐解くための有用情報の選抜が大きな困難になってくることは必然である．そのため多階層オミクス解析データの解析技術の発展による，多量データからの有効なデータマイニングが必要不可欠であると考えられる．近年では *Streptomyces* 属のゲノムスケール代謝モデルの構築ならびに代謝モデルに対するオミクス解析の統合例も報告されている [68, 113]．代謝物データは代謝モデルにおける有効な束縛条件となるデータであるため，今後は代謝モデルによる解析手法を含めたオミクス解析データの円滑な解析が進むことで，抗生物質生産の制御解明に資する知見が獲得されることを期待する．

4. 3 を踏まえて，今後においても適切なデータを蓄積していく必要性があると考えられる．というのも統合オミクス解析において，各階層のオミクス解析結果は必ずしも一致しないためである．そこで事前に試料の品質，分析手法の妥当性，データの再現性の 3 点に留意することでデータの妥当性を担保することが必要不可欠である．

引用文献

1. Procopio, R. E.; Silva, I. R.; Martins, M. K.; Azevedo, J. L.; Araujo, J. M., Antibiotics produced by Streptomyces. *Braz J Infect Dis* **2012,** *16* (5), 466-71.

2. Patrick, J. B.; Williams, R. P.; Wolf, C. F.; Webb, J. S., Pimaricin .1. Oxidation and Hydrolysis Products. *J Am Chem Soc* **1959,** *80* (24), 6688-6689.

3. Patrick, J. B.; Williams, R. P.; Webb, J. S., Pimaricin .2. The Structure of Pimaricin. *J Am Chem Soc* **1959,** *80* (24), 6689-6689.

4. Burg, R. W.; Miller, B. M.; Baker, E. E.; Birnbaum, J.; Currie, S. A.; Hartman, R.; Kong, Y. L.; Monaghan, R. L.; Olson, G.; Putter, I.; Tunac, J. B.; Wallick, H.; Stapley, E. O.; Oiwa, R.; Omura, S., Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents - Producing Organism and Fermentation. *Antimicrob Agents Ch* **1979,** *15* (3), 361-367.

5. Egerton, J. R.; Ostlind, D. A.; Blair, L. S.; Eary, C. H.; Suhayda, D.; Cifelli, S.; Riek, R. F.; Campbell, W. C., Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents - Efficacy of the B1a Component. *Antimicrob Agents Ch* **1979,** *15* (3), 372-378.

6. Miller, T. W.; Chaiet, L.; Cole, D. J.; Cole, L. J.; Flor, J. E.; Goegelman, R. T.; Gullo, V. P.; Joshua, H.; Kempf, A. J.; Krellwitz, W. R.; Monaghan, R. L.; Ormond, R. E.; Wilson, K. E.; Albersschonberg, G.; Putter, I., Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents - Isolation and Chromatographic Properties. *Antimicrob Agents Ch* **1979,** *15* (3), 368-371.

7. Hata, T.; Hoshi, T.; Kanamori, K.; Matsumae, A.; Sano, Y.; Shima, T.; Sugawara, R., Mitomycin, a new antibiotic from Streptomyces. I. *J Antibiot (Tokyo)* **1956,** *9* (4), 141-6.

8. Hata, T.; Sugawara, R., Mitomycin, a new antibiotic from Streptomyces. II. Description of the strain. *J Antibiot (Tokyo)* **1956,** *9* (4), 147-51.

9. Kino, T.; Hatanaka, H.; Hashimoto, M.; Nishiyama, M.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H., FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo)* **1987,** *40* (9), 1249-55.

10. Kino, T.; Hatanaka, H.; Miyata, S.; Inamura, N.; Nishiyama, M.; Yajima, T.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; et al., FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* **1987,** *40* (9), 1256-65.

11. Waksman, S. A.; Reilly, H. C.; Johnstone, D. B., Isolation of Streptomycin-producing Strains of Streptomyces griseus. *J Bacteriol* **1946,** *52* (3), 393-7.

12. Berdy, J., Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* **2005,** *58* (1), 1-26.

13. Hutchings, M. I.; Truman, A. W.; Wilkinson, B., Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* **2019,** *51*, 72-80.

14. Liu, R.; Deng, Z.; Liu, T., Streptomyces species: Ideal chassis for natural product discovery and overproduction. *Metab Eng* **2018,** *50*, 74-84.

15. Lee, N.; Kim, W.; Hwang, S.; Lee, Y.; Cho, S.; Palsson, B.; Cho, B. K., Thirty complete Streptomyces genome sequences for mining novel secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Sci Data* **2020,**

7 (1), 55.

16. Ziemert, N.; Alanjary, M.; Weber, T., The evolution of genome mining in microbes - a review. *Nat Prod Rep* **2016,** *33* (8), 988-1005.

17. Medema, M. H.; Blin, K.; Cimermancic, P.; de Jager, V.; Zakrzewski, P.; Fischbach, M. A.; Weber, T.; Takano, E.; Breitling, R., antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* **2011,** *39* (Web Server issue), W339-46.

18. Blin, K.; Medema, M. H.; Kazempour, D.; Fischbach, M. A.; Breitling, R.; Takano, E.; Weber, T., antiSMASH 2.0--a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res* **2013,** *41* (Web Server issue), W204-12.

19. Weber, T.; Blin, K.; Duddela, S.; Krug, D.; Kim, H. U.; Bruccoleri, R.; Lee, S. Y.; Fischbach, M. A.; Muller, R.; Wohlleben, W.; Breitling, R.; Takano, E.; Medema, M. H., antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res* **2015,** *43* (W1), W237-43.

20. Blin, K.; Wolf, T.; Chevrette, M. G.; Lu, X.; Schwalen, C. J.; Kautsar, S. A.; Suarez Duran, H. G.; de Los Santos, E. L. C.; Kim, H. U.; Nave, M.; Dickschat, J. S.; Mitchell, D. A.; Shelest, E.; Breitling, R.; Takano, E.; Lee, S. Y.; Weber, T.; Medema, M. H., antiSMASH 4.0-improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic Acids Res* **2017,** *45* (W1), W36-W41.

21. Blin, K.; Shaw, S.; Steinke, K.; Villebro, R.; Ziemert, N.; Lee, S. Y.; Medema, M. H.; Weber, T., antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res* **2019,** *47* (W1), W81-W87.

22. Kozakai, R.; Ono, T.; Hoshino, S.; Takahashi, H.; Katsuyama, Y.; Sugai, Y.; Ozaki, T.; Teramoto, K.; Teramoto, K.; Tanaka, K.; Abe, I.; Asamizu, S.; Onaka, H., Acyltransferase that catalyses the condensation of polyketide and peptide moieties of goadvionin hybrid lipopeptides. *Nat Chem* **2020,** *12* (9), 869.

23. Genilloud, O., Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Nat Prod Rep* **2017,** *34* (10), 1203-1232.

24. Scherlach, K.; Hertweck, C., Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org Biomol Chem* **2009,** *7* (9), 1753-60.

25. Olano, C.; Lombo, F.; Mendez, C.; Salas, J. A., Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab Eng* **2008,** *10* (5), 281-92.

26. Strauch, E.; Takano, E.; Baylis, H. A.; Bibb, M. J., The stringent response in Streptomyces coelicolor A3(2). *Mol Microbiol* **1991,** *5* (2), 289-98.

27. Okamoto, S.; Lezhava, A.; Hosaka, T.; Okamoto-Hosoya, Y.; Ochi, K., Enhanced expression of S-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in Streptomyces coelicolor A3(2). *J Bacteriol* **2003,** *185* (2), 601-9.

28. Uguru, G. C.; Stephens, K. E.; Stead, J. A.; Towle, J. E.; Baumberg, S.; McDowall, K. J., Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in Streptomyces coelicolor. *Mol Microbiol* **2005,** *58* (1), 131-50.

29. Xu, M.; Wang, Y.; Zhao, Z.; Gao, G.; Huang, S. X.; Kang, Q.; He, X.; Lin, S.; Pang, X.;

Deng, Z.; Tao, M., Functional Genome Mining for Metabolites Encoded by Large Gene Clusters through Heterologous Expression of a Whole-Genome Bacterial Artificial Chromosome Library in Streptomyces spp. *Appl Environ Microbiol* **2016,** *82* (19), 5795-805.

30. Onaka, H.; Mori, Y.; Igarashi, Y.; Furumai, T., Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in Streptomyces species. *Appl Environ Microbiol* **2011,** *77* (2), 400-6.

31. Tanaka, Y.; Kasahara, K.; Hirose, Y.; Murakami, K.; Kugimiya, R.; Ochi, K., Activation and products of the cryptic secondary metabolite biosynthetic gene clusters by rifampin resistance (rpoB) mutations in actinomycetes. *J Bacteriol* **2013,** *195* (13), 2959-70.

32. Jin, Y. Y.; Cheng, J.; Yang, S. H.; Meng, L.; Palaniyandi, S. A.; Zhao, X. Q.; Suh, J. W., S-adenosyl-L-methionine activates actinorhodin biosynthesis by increasing autophosphorylation of the Ser/Thr protein kinase AfsK in Streptomyces coelicolor A3(2). *Biosci Biotechnol Biochem* **2011,** *75* (5), 910-3.

33. Liu, G.; Chater, K. F.; Chandra, G.; Niu, G.; Tan, H., Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in streptomyces. *Microbiol Mol Biol Rev* **2013,** *77* (1), 112-43.

34. Worthen, D. B., Streptomyces in nature and medicine: The antibiotic makers. *J Hist Med All Sci* **2008,** *63* (2), 273-274.

35. Bentley, S. D.; Chater, K. F.; Cerdeno-Tarraga, A. M.; Challis, G. L.; Thomson, N. R.; James, K. D.; Harris, D. E.; Quail, M. A.; Kieser, H.; Harper, D.; Bateman, A.; Brown, S.; Chandra, G.; Chen, C. W.; Collins, M.; Cronin, A.; Fraser, A.; Goble, A.; Hidalgo, J.; Hornsby, T.; Howarth, S.; Huang, C. H.; Kieser, T.; Larke, L.; Murphy, L.; Oliver, K.; O'Neil, S.; Rabbinowitsch, E.; Rajandream, M. A.; Rutherford, K.; Rutter, S.; Seeger, K.; Saunders, D.; Sharp, S.; Squares, R.; Squares, S.; Taylor, K.; Warren, T.; Wietzorrek, A.; Woodward, J.; Barrell, B. G.; Parkhill, J.; Hopwood, D. A., Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2). *Nature* **2002,** *417* (6885), 141-7.

36. Nett, M.; Ikeda, H.; Moore, B. S., Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* **2009,** *26* (11), 1362-84.

37. van der Heul, H. U.; Bilyk, B. L.; McDowall, K. J.; Seipke, R. F.; van Wezel, G. P., Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: new perspectives from the post-genomic era. *Nat Prod Rep* **2018,** *35* (6), 575-604.

38. Gramajo, H. C.; Takano, E.; Bibb, M. J., Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in Streptomyces coelicolor A3(2) is transcriptionally regulated. *Mol Microbiol* **1993,** *7* (6), 837-45.

39. Lee, P. C.; Umeyama, T.; Horinouchi, S., afsS is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in Streptomyces coelicolor A3(2). *Molecular Microbiology* **2002,** *43* (6), 1413-1430.

40. den Hengst, C. D.; Tran, N. T.; Bibb, M. J.; Chandra, G.; Leskiw, B. K.; Buttner, M. J., Genes essential for morphological development and antibiotic production in Streptomyces coelicolor are targets of BldD during vegetative growth. *Mol Microbiol* **2010,** *78* (2), 361-79.

41. Fernandez-Moreno, M. A.; Caballero, J. L.; Hopwood, D. A.; Malpartida, F., The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the bldA tRNA gene of

Streptomyces. *Cell* **1991,** *66* (4), 769-80.

42. Iqbal, M.; Mast, Y.; Amin, R.; Hodgson, D. A.; Consortium, S.; Wohlleben, W.; Burroughs, N. J., Extracting regulator activity profiles by integration of de novo motifs and expression data: characterizing key regulators of nutrient depletion responses in Streptomyces coelicolor. *Nucleic Acids Res* **2012,** *40* (12), 5227-39.

43. Nothaft, H.; Rigali, S.; Boomsma, B.; Swiatek, M.; McDowall, K. J.; van Wezel, G. P.; Titgemeyer, F., The permease gene nagE2 is the key to N-acetylglucosamine sensing and utilization in Streptomyces coelicolor and is subject to multi-level control. *Molecular Microbiology* **2010,** *75* (5), 1133-1144.

44. Chakraburtty, R.; Bibb, M., The ppGpp synthetase gene (relA) of Streptomyces coelicolor A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J Bacteriol* **1997,** *179* (18), 5854-61.

45. Dalebroux, Z. D.; Swanson, M. S., ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nat Rev Microbiol* **2012,** *10* (3), 203-12.

46. Wang, R.; Mast, Y.; Wang, J.; Zhang, W.; Zhao, G.; Wohlleben, W.; Lu, Y.; Jiang, W., Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in Streptomyces coelicolor. *Mol Microbiol* **2013,** *87* (1), 30-48.

47. Swiatek, M. A.; Gubbens, J.; Bucca, G.; Song, E.; Yang, Y. H.; Laing, E.; Kim, B. G.; Smith, C. P.; van Wezel, G. P., The ROK family regulator Rok7B7 pleiotropically affects xylose utilization, carbon catabolite repression, and antibiotic production in streptomyces coelicolor. *J Bacteriol* **2013,** *195* (6), 1236-48.

48. Santos-Beneit, F.; Rodriguez-Garcia, A.; Sola-Landa, A.; Martin, J. F., Cross-talk between two global regulators in Streptomyces: PhoP and AfsR interact in the control of afsS, pstS and phoRP transcription. *Molecular Microbiology* **2009,** *72* (1), 53-68.

49. Martin, J. F., Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *Journal of Bacteriology* **2004,** *186* (16), 5197-5201.

50. Takano, E., gamma-Butyrolactones: Streptomyces signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol* **2006,** *9* (3), 287-294.

51. Tanaka, Y.; Hosaka, T.; Ochi, K., Rare earth elements activate the secondary metabolite-biosynthetic gene clusters in Streptomyces coelicolor A3(2). *J Antibiot (Tokyo)* **2010,** *63* (8), 477-81.

52. Craney, A.; Ozimok, C.; Pimentel-Elardo, S. M.; Capretta, A.; Nodwell, J. R., Chemical perturbation of secondary metabolism demonstrates important links to primary metabolism. *Chem Biol* **2012,** *19* (8), 1020-7.

53. Huang, J.; Shi, J.; Molle, V.; Sohlberg, B.; Weaver, D.; Bibb, M. J.; Karoonuthaisiri, N.; Lih, C. J.; Kao, C. M.; Buttner, M. J.; Cohen, S. N., Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of Streptomyces coelicolor. *Mol Microbiol* **2005,** *58* (5), 1276-87.

54. Ishii, N.; Nakahigashi, K.; Baba, T.; Robert, M.; Soga, T.; Kanai, A.; Hirasawa, T.; Naba, M.; Hirai, K.; Hoque, A.; Ho, P. Y.; Kakazu, Y.; Sugawara, K.; Igarashi, S.; Harada, S.; Masuda, T.; Sugiyama, N.; Togashi, T.; Hasegawa, M.; Takai, Y.; Yugi, K.; Arakawa, K.; Iwata, N.; Toya, Y.; Nakayama, Y.; Nishioka, T.; Shimizu, K.; Mori, H.; Tomita, M., Multiple high-throughput analyses monitor the response of E. coli to perturbations. *Science* **2007,** *316* (5824), 593-7.

55. Fiehn, O., Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* **2002,** *48* (1-2),

155-171.

56. Misra, B. B.; Langefeld, C. D.; Olivier, M.; Cox, L. A., Integrated Omics: Tools, Advances, and Future Approaches. *J Mol Endocrinol* **2018**.

57. Hackett, S. R.; Zanotelli, V. R. T.; Xu, W. X.; Goya, J.; Park, J. O.; Perlman, D. H.; Gibney, P. A.; Botstein, D.; Storey, J. D.; Rabinowitz, J. D., Systems-level analysis of mechanisms regulating yeast metabolic flux. *Science* **2016,** *354* (6311).

58. Nishiguchi, H.; Hiasa, N.; Uebayashi, K.; Liao, J.; Shimizu, H.; Matsuda, F., Transomics data-driven, ensemble kinetic modeling for system-level understanding and engineering of the cyanobacteria central metabolism. *Metab Eng* **2019,** *52*, 273-283.

59. Pinu, F. R.; Beale, D. J.; Paten, A. M.; Kouremenos, K.; Swarup, S.; Schirra, H. J.; Wishart, D., Systems Biology and Multi-Omics Integration: Viewpoints from the Metabolomics Research Community. *Metabolites* **2019,** *9* (4).

60. Robertsen, H. L.; Weber, T.; Kim, H. U.; Lee, S. Y., Toward Systems Metabolic Engineering of Streptomycetes for Secondary Metabolites Production. *Biotechnol J* **2018,** *13* (1).

61. Nieselt, K.; Battke, F.; Herbig, A.; Bruheim, P.; Wentzel, A.; Jakobsen, O. M.; Sletta, H.; Alam, M. T.; Merlo, M. E.; Moore, J.; Omara, W. A.; Morrissey, E. R.; Juarez-Hermosillo, M. A.; Rodriguez-Garcia, A.; Nentwich, M.; Thomas, L.; Iqbal, M.; Legaie, R.; Gaze, W. H.; Challis, G. L.; Jansen, R. C.; Dijkhuizen, L.; Rand, D. A.; Wild, D. L.; Bonin, M.; Reuther, J.; Wohlleben, W.; Smith, M. C.; Burroughs, N. J.; Martin, J. F.; Hodgson, D. A.; Takano, E.; Breitling, R.; Ellingsen, T. E.; Wellington, E. M., The dynamic architecture of the metabolic switch in Streptomyces coelicolor. *BMC Genomics* **2010,** *11*, 10.

62. Jeong, Y.; Kim, J. N.; Kim, M. W.; Bucca, G.; Cho, S.; Yoon, Y. J.; Kim, B. G.; Roe, J. H.; Kim, S. C.; Smith, C. P.; Cho, B. K., The dynamic transcriptional and translational landscape of the model antibiotic producer Streptomyces coelicolor A3(2). *Nat Commun* **2016,** *7*, 11605.

63. Manteca, A.; Sanchez, J.; Jung, H. R.; Schwammle, V.; Jensen, O. N., Quantitative proteomics analysis of Streptomyces coelicolor development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Mol Cell Proteomics* **2010,** *9* (7), 1423-36.

64. Manteca, A.; Ye, J.; Sanchez, J.; Jensen, O. N., Phosphoproteome analysis of Streptomyces development reveals extensive protein phosphorylation accompanying bacterial differentiation. *J Proteome Res* **2011,** *10* (12), 5481-92.

65. Wentzel, A.; Sletta, H.; Stream, C.; Ellingsen, T. E.; Bruheim, P., Intracellular Metabolite Pool Changes in Response to Nutrient Depletion Induced Metabolic Switching in Streptomyces coelicolor. *Metabolites* **2012,** *2* (1), 178-94.

66. Rodriguez-Garcia, A.; Barreiro, C.; Santos-Beneit, F.; Sola-Landa, A.; Martin, J. F., Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in Streptomyces coelicolor M145 and in a Delta phoP mutant. *Proteomics* **2007,** *7* (14), 2410-2429.

67. Sulheim, S.; Kumelj, T.; van Dissel, D.; Salehzadeh-Yazdi, A.; Du, C.; van Wezel, G. P.; Nieselt, K.; Almaas, E.; Wentzel, A.; Kerkhoven, E. J., Enzyme-Constrained Models and Omics Analysis of

Streptomyces coelicolor Reveal Metabolic Changes that Enhance Heterologous Production. *iScience* **2020,** *23* (9), 101525.

68. Amara, A.; Takano, E.; Breitling, R., Development and validation of an updated computational model of Streptomyces coelicolor primary and secondary metabolism. *BMC Genomics* **2018,** *19* (1), 519.

69. Rioseras, B.; Shliaha, P. V.; Gorshkov, V.; Yague, P.; Lopez-Garcia, M. T.; Gonzalez-Quinonez, N.; Kovalchuk, S.; Rogowska-Wrzesinska, A.; Jensen, O. N.; Manteca, A., Quantitative Proteome and Phosphoproteome Analyses of Streptomyces coelicolor Reveal Proteins and Phosphoproteins Modulating Differentiation and Secondary Metabolism. *Mol Cell Proteomics* **2018,** *17* (8), 1591-1611.

70. Liu, X. Y.; Wang, T.; Sun, X. J.; Wang, Z. J.; Tian, X. W.; Zhuang, Y. P.; Chu, J., Optimized sampling protocol for mass spectrometry-based metabolomics in Streptomyces. *Bioresour Bioprocess* **2019,** *6* (1).

71. Kol, S.; Merlo, M. E.; Scheltema, R. A.; de Vries, M.; Vonk, R. J.; Kikkert, N. A.; Dijkhuizen, L.; Breitling, R.; Takano, E., Metabolomic characterization of the salt stress response in Streptomyces coelicolor. *Appl Environ Microbiol* **2010,** *76* (8), 2574-81.

72. Jankevics, A.; Merlo, M. E.; de Vries, M.; Vonk, R. J.; Takano, E.; Breitling, R., Metabolomic analysis of a synthetic metabolic switch in Streptomyces coelicolor A3(2). *Proteomics* **2011,** *11* (24), 4622-31.

73. Dobin, A.; Davis, C. A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T. R., STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013,** *29* (1), 15-21.

74. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R.; Genome Project Data Processing, S., The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009,** *25* (16), 2078-9.

75. Lawrence, M.; Huber, W.; Pages, H.; Aboyoun, P.; Carlson, M.; Gentleman, R.; Morgan, M. T.; Carey, V. J., Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS Comput Biol* **2013,** *9* (8), e1003118.

76. Love, M. I.; Huber, W.; Anders, S., Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **2014,** *15* (12), 550.

77. Ge, S. X.; Son, E. W.; Yao, R., iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* **2018,** *19* (1), 534.

78. Huang da, W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A., Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* **2009,** *37* (1), 1-13.

79. Huang da, W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A., Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **2009,** *4* (1), 44-57.

80. Gomez-Escribano, J. P.; Bibb, M. J., Engineering Streptomyces coelicolor for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Biotechnol* **2011,** *4* (2), 207-215.

81. Flinspach, K.; Kapitzke, C.; Tocchetti, A.; Sosio, M.; Apel, A. K., Heterologous expression of the thiopeptide antibiotic GE2270 from Planobispora rosea ATCC 53733 in Streptomyces coelicolor requires deletion of ribosomal genes from the expression construct. *PLoS One* **2014,** *9* (3), e90499.

82. Coze, F.; Gilard, F.; Tcherkez, G.; Virolle, M. J.; Guyonvarch, A., Carbon-Flux Distribution within Streptomyces coelicolor Metabolism: A Comparison between the Actinorhodin-Producing Strain M145 and Its Non-Producing Derivative M1146. *Plos One* **2013,** *8* (12).

83. Taylor, P. J., Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* **2005,** *38* (4), 328-34.

84. Bennett, B. D.; Kimball, E. H.; Gao, M.; Osterhout, R.; Van Dien, S. J.; Rabinowitz, J. D., Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in Escherichia coli. *Nat Chem Biol* **2009,** *5* (8), 593-9.

85. Dempo, Y.; Ohta, E.; Nakayama, Y.; Bamba, T.; Fukusaki, E., Molar-based targeted metabolic profiling of cyanobacterial strains with potential for biological production. *Metabolites* **2014,** *4* (2), 499-516.

86. Ongley, S. E.; Bian, X.; Neilan, B. A.; Muller, R., Recent advances in the heterologous expression of microbial natural product biosynthetic pathways. *Nat Prod Rep* **2013,** *30* (8), 1121-38.

87. Gomez-Escribano, J. P.; Bibb, M. J., Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in Streptomyces coelicolor: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2014,** *41* (2), 425-31.

88. Nah, H. J.; Pyeon, H. R.; Kang, S. H.; Choi, S. S.; Kim, E. S., Cloning and Heterologous Expression of a Large-sized Natural Product Biosynthetic Gene Cluster in Streptomyces Species. *Front Microbiol* **2017,** *8*, 394.

89. Xu, J.; Tozawa, Y.; Lai, C.; Hayashi, H.; Ochi, K., A rifampicin resistance mutation in the rpoB gene confers ppGpp-independent antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3(2). *Mol Genet Genomics* **2002,** *268* (2), 179-89.

90. Naseer, N.; Shapiro, J. A.; Chander, M., RNA-Seq analysis reveals a six-gene SoxR regulon in Streptomyces coelicolor. *PLoS One* **2014,** *9* (8), e106181.

91. Mak, S.; Nodwell, J. R., Actinorhodin is a redox-active antibiotic with a complex mode of action against Gram-positive cells. *Molecular Microbiology* **2017,** *106* (4), 597-613.

92. Dela Cruz, R.; Gao, Y.; Penumetcha, S.; Sheplock, R.; Weng, K.; Chander, M., Expression of the Streptomyces coelicolor SoxR regulon is intimately linked with actinorhodin production. *J Bacteriol* **2010,** *192* (24), 6428-38.

93. Shin, J. H.; Singh, A. K.; Cheon, D. J.; Roe, J. H., Activation of the SoxR regulon in Streptomyces coelicolor by the extracellular form of the pigmented antibiotic actinorhodin. *J Bacteriol* **2011,** *193* (1), 75-81.

94. Cooper, D. M., Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J* **2003,** *375* (Pt 3), 517-29.

95. Kolb, A.; Busby, S.; Buc, H.; Garges, S.; Adhya, S., Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* **1993,** *62*, 749-95.

96. Stulke, J.; Hillen, W., Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **1999,** *2* (2), 195-201.

97. Romero-Rodriguez, A.; Rocha, D.; Ruiz-Villafan, B.; Guzman-Trampe, S.; Maldonado-Carmona, N.; Vazquez-Hernandez, M.; Zelarayan, A.; Rodriguez-Sanoja, R.; Sanchez, S., Carbon catabolite regulation in Streptomyces: new insights and lessons learned. *World J Microbiol Biotechnol* **2017,** *33* (9), 162.

98. Roesler, W. J.; Vandenbark, G. R.; Hanson, R. W., Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem* **1988,** *263* (19), 9063-6.

99. Susstrunk, U.; Pidoux, J.; Taubert, S.; Ullmann, A.; Thompson, C. J., Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in Streptomyces coelicolor. *Mol Microbiol* **1998,** *30* (1), 33-46.

100. Gao, C.; Hindra; Mulder, D.; Yin, C.; Elliot, M. A., Crp Is a Global Regulator of Antibiotic Production in Streptomyces. *Mbio* **2012,** *3* (6).

101. Derouaux, A.; Halici, S.; Nothaft, H.; Neutelings, T.; Moutzourelis, G.; Dusart, J.; Titgemeyer, F.; Rigali, S., Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of Streptomyces coelicolor. *J Bacteriol* **2004,** *186* (6), 1893-7.

102. Latoscha, A.; Wormann, M. E.; Tschowri, N., Nucleotide second messengers in Streptomyces. *Microbiology (Reading)* **2019,** *165* (11), 1153-1165.

103. Saito, N.; Xu, J.; Hosaka, T.; Okamoto, S.; Aoki, H.; Bibb, M. J.; Ochi, K., EshA accentuates ppGpp accumulation and is conditionally required for antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3(2). *J Bacteriol* **2006,** *188* (13), 4952-61.

104. Hutchings, M. I.; Hoskisson, P. A.; Chandra, G.; Buttner, M. J., Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of Streptomyces coelicolor A3(2). *Microbiology (Reading)* **2004,** *150* (Pt 9), 2795-2806.

105. Cihak, M.; Kamenik, Z.; Smidova, K.; Bergman, N.; Benada, O.; Kofronova, O.; Petrickova, K.; Bobek, J., Secondary Metabolites Produced during the Germination of Streptomyces coelicolor. *Front Microbiol* **2017,** *8*, 2495.

106. Lim, Y.; Jung, E. S.; Lee, J. H.; Kim, E. J.; Hong, S. J.; Lee, Y. H.; Lee, C. H., Non-targeted metabolomics unravels a media-dependent prodiginines production pathway in Streptomyces coelicolor A3(2). *PLoS One* **2018,** *13* (11), e0207541.

107. Goodenough-Lashua, D. M.; Garcia, G. A., tRNA-guanine transglycosylase from E. coli: a ping-pong kinetic mechanism is consistent with nucleophilic catalysis. *Bioorg Chem* **2003,** *31* (4), 331-44.

108. Fernandez, J. R.; Sweet, E. S.; Welsh, W. J.; Firestein, B. L., Identification of small molecule compounds with higher binding affinity to guanine deaminase (cypin) than guanine. *Bioorg Med Chem* **2010,** *18* (18), 6748-55.

109. Pathak, C.; Jaiswal, Y. K.; Vinayak, M., Hypomodification of transfer RNA in cancer with respect to queuosine. *RNA Biol* **2005,** *2* (4), 143-8.

110. Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Shinose, M.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M.; Omura, S., Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism Streptomyces avermitilis. *Nat Biotechnol* **2003,** *21* (5), 526-31.

111. Wang, L.; Xing, X.; Chen, L.; Yang, L.; Su, X.; Rabitz, H.; Lu, W.; Rabinowitz, J. D., Peak Annotation and Verification Engine for Untargeted LC-MS Metabolomics. *Anal Chem* **2019,** *91* (3), 1838-1846.

112. Yugi, K.; Kubota, H.; Hatano, A.; Kuroda, S., Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple 'Omic' Layers. *Trends Biotechnol* **2016,** *34* (4), 276-290.

113. Kumelj, T.; Sulheim, S.; Wentzel, A.; Almaas, E., Predicting Strain Engineering Strategies Using iKS1317: A Genome-Scale Metabolic Model of Streptomyces coelicolor. *Biotechnol J* **2019,** *14* (4), e1800180.

発表論文

1. **Katsuaki Nitta**, Walter A. Lavina, Sammy Pontreli, James C. Liao, Sastia P. Putri, Eiichiro Fukusaki
「Orthogonal partial least squares/projections to latent structures regression-based metabolomics approach for identification of gene targets for improvement of 1-butanol production in *Escherichia coli*」
J. Biosci. Bioeng., **124**, Issue 5, 498-505 (2017)

2. Sastia P. Putri, Yasumune Nakayama, Claire Shen, Shingo Noguchi, **Katsuaki Nitta**, Takeshi Bamba, Sammy Pontreli, James C. Liao, Eiichiro Fukusaki
「Identifying metabolic elements that contribute to productivity of 1-propanol bioproduction using metabolmics analysis」
Metabolomics, **14**, Issue 7, 1-14 (2018)

3. **Katsuaki Nitta**, Walter A. Lavina, Sammy Pontreli, James C. Liao, Sastia P. Putri, Eiichiro Fukusaki
「Metabolome analysis revealed the knockout of glyoxylate shunt as an effective strategy for improvement of 1-butanol production in transgenic *Escherichia coli*」
J. Biosci. Bioeng., **127**, Issue 3, 301-308 (2019)

4. Makoto Imura, **Katsuaki Nitta**, Ryo Iwakiri, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, Eiichiro Fukusaki
「Comparison of metabolic profiles of yeasts based on the difference of the Crabtree positive and negative」
J. Biosci. Bioeng., **129**, Issue 1, 52-58 (2019)

5. **Katsuaki Nitta**, Francesco D. Carratore, Rainer Breitling, Eriko Takano, Sastia P. Putri, Eiichiro Fukusaki
「Multi-omics analysis of the effect of cAMP on actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor*」
Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, **8**, 595552 (2020)
*本学位論文に関連する論文

6. **Katsuaki Nitta**, Rainer Breitling, Eriko Takano, Sastia P. Putri, Eiichiro Fukusaki
「Investigation of effects of actinorhodin biosynthetic gene cluster expression and a *rpoB* point mutation on the metabolome of *Streptomyces coelicolor* M1146」
J. Biosci. Bioeng., In Press (2021)
*本学位論文に関連する論文

学会発表(国内・国外)

1. ○**新田克章**, Sastia Putri, Sammy Pontreli, James C. Liao, 福崎英一郎
「Gene targets selection for 1-butanol production improvement in *Escherichia coli* by correlation-based metabolomics」
第 69 回日本生物工学会年次大会，東京，2017 年 9 月

2. ○**新田克章**，Sastia Putri, Sammy Pontreli, James C. Liao, 福崎英一郎
「代謝物相関解析を用いた，1-ブタノール生産大腸菌改良における遺伝子改変標的の特定」
第 11 回メタボロームシンポジウム，大阪，2017 年 11 月

3. ○**Katsuaki Nitta**, Sastia Putri, Sammy Pontreli, James C. Liao, Eiichiro Fukusaki
「1-Butanol production improvement in transgenic *Escherichia coli* by regression model-based metabolomics」
Metabolomics conference 2018, Seattle, USA, June, 2018

4. ○**新田克章**，Sastia Putri, Eriko Takano, 福崎英一郎
「放線菌 *Streptomyces coelicolor* のメタボローム分析における分析対象代謝物範囲の拡大」
第 70 回日本生物工学会年次大会，大阪，2018 年，6 月

5. ○**新田克章**，古野正浩，福崎英一郎
「LC-MS/MS を用いたアシル CoA の網羅的な分析法開発に向けた検討」
第 12 回メタボロームシンポジウム，山形，2018 年，11 月

6. ○**Katsuaki Nitta**, Masahiro Furuno, Sastia Putri, Eriko Takano and Eiichiro Fukusaki
「Development of LC-MS/MS based acyl-CoAs analysis method and its application to *Streptomyces coelicolor*」
Metabolomics conference 2019, Den Haag, Netherland, June, 2019

7. ○井村誠，**新田克章**，岩切亮，松田史生，清水浩，福崎英一郎
「クラブトリ―陽性および陰性の差異に基づく酵母代謝のプロファイル比較」
第 71 回日本生物工学会年次大会，岡山，2019 年，9 月

8. ○平林翼，折田和泉，**新田克章**，福崎英一郎，福居俊昭
Methylobrum extorquens における代替 C1 資化経路導入株の解析
第 71 回日本生物工学会年次大会，岡山，2019 年，9 月

9. ○平林翼，折田和泉，**新田克章**，福崎英一郎，福居俊昭
Methylobrum extorquens における代替 C1 資化経路導入株の解析
第 13 回メタボロームシンポジウム，つくば，2019 年，11 月

謝辞

本博士論文は著者が大阪大学大学院　工学研究科　生命先端工学専攻在籍時に行った研究をもとにまとめられたものである.

本研究を遂行するに当たり，ご指導を賜りました大阪大学　大学院　工学研究科 福崎英一郎教授に謝意を表します.

本博士論文作成に当たり貴重なご指導，ご助言，およびご校閲を賜りました大阪大学 大学院 情報科学研究科 清水浩教授，大阪大学 生物工学国際交流センター 本田孝祐教授に厚く感謝申し上げます.

また研究を遂行するに当たり研究室生活全般および研究に対するご指導においてご支援を賜りました新間秀一准教授および小野比佐好元助教授に感謝致します.

著者のメンター教官である Sastia Prama Putri 助教授には研究室に在籍してから 6 年間において，投稿論文作成に関する多大なるご指導をいただいただけではなく，常に論理的なご助言を基に指針を示してくださいました．厚く御礼申し上げます.

著者のもうひとりのメンター教官である University of Manchester, Manchester Institute of Biotechnology, Eriko Takano 教授には，本博士論文に関連する研究全般において細部に至るまで研究の議論を日夜させていただき，研究においてサイエンスを追求することの意義・喜びをご指導くださいました．また Takano 教授の研究室への複数回に渡る渡航費用並びに実験費用をご支援いただきました．厚く御礼申し上げます.

また, 放線菌 *S.coelicolor* の菌株作成ならびに培養方法の指導, RNA 処理方法の指導, LC-Q-Exactive によるメタボローム解析法の指導においてご支援をいただきました, Prof. Eriko Takano 研究室のメンバーである，Dr. Suhui Ye Huang, Dr. Adam Amara, Dr. Oksana Bilyk, Dr. Katherine Hollywood, Dr. Kamila Schmidt に感謝致します.

本博士論文研究における RNAseq データのプログラミングによるデータ解析に関するご指導ならびに本博士論文に関連する投稿論文に対するご助言をいただきました Univeristy of Manchester, Manchester Institute of Biotechnology Prof. Rainer Breitling およ

び Dr. Francesco Del Carratore に感謝申し上げます.

本博士論文研究における LC Q-TOF MS による抗生物質測定において機器の使用ならびに貴重なご助言を賜りました 島津製作所 飯田順子博士, 渡邊淳氏に感謝致します.

本博士論文における RNAseq 解析のための菌体破砕機および Nano drop を使用させていただきました大阪大学歯学研究科 予防歯科学教室 久保庭雅恵准教授, 坂中哲人助教授に感謝致します.

常日頃の研究室生活におきまして多大なるご支援をいただきました，著者が大阪大学大学院　工学研究科 生物資源工学領域に在籍を始めてから現在までにおいて出会った全ての先輩方，後輩の皆様，秘書の皆様に感謝致します.

LC-MS/MS によるアシル CoA の分析法開発において, 細部に渡るご指導をいただきました大阪大学大学院 工学研究科 生命先端工学専攻 古野正浩研究員に感謝致します.

著者が大阪大学 工学部における学士過程在籍時ならびに大阪大学大学院 工学研究科において修士課程在籍時に参画していた UCLA との共同研究において大変お世話になりました Dr. Walter Lavina (現 University of the Philippines Los Banos 助教授) ならびに Dr. Sammy Pontreli (現 ETH 博士研究員) に感謝いたします.

本研究は日本学術振興会特別研究員奨励費 (課題番号：19J10382) および BBSRC Japan-Manchester Partnering Award (課題番号：BB/N021975/1) の助成を受け，遂行されました.

最後に, 長年に渡る経済的支援を続けてくれた父、ここまで辛抱強く育ててくれた母, 献身的に応援をくれた祖父母や弟，日頃から大変お世話になっている義父母，そして博士課程の３年間において常に側にいてくれた最愛の妻に感謝の意を表して謝辞と致します.

2020 年 12 月

補足資料

図表 S1　各代謝物の略称

図表 S2　イオンペア **LC-MS/MS** における各代謝物の **MRM** トランシジョンおよび **RT (**相対定量用**)**

図表 S3　糖リン酸分析における **MRM** トランシジョンおよび **RT (**相対定量用**)**

図表 S4　**PFPP** カラムを用いた **LC-MS/MS** 分析系における各代謝物の **MRM** トランシジョンおよび **RT (**相対定量用**)**

図表 S5　イオンペア **LC-MS/MS** における各代謝物の **MRM** トランシジョン **(**絶対定量用**)**

図表 S6　糖リン酸分析における各代謝物の **MRM** トランシジョン **(**絶対定量用**)**

図表 S7　**PFPP** カラムを用いた **LC-MS/MS** 分析系における各代謝物の **MRM** トランシジョン **(**絶対定量用**)**

図表 S8　絶対定量データにおける代謝物の分類

図表 S9　**M1146** 株における細胞内代謝物の絶対濃度 **(μmol/mg)**

図表 S10　**M1146** 株における細胞外代謝物の絶対濃度 **(μM)**

図表 S11　代謝物の絶対濃度データおよび各代謝物の添加回収率

図表 S12　**M1146, M1146+ACT** の経時変化トランスクリプトーム解析における **DEG**

図表 S13　**S12** における **DEG** に対する **GSEA** 解析結果のリスト

図表 S14　**M145** に **cAMP** を添加した際のトランスクリプトーム解析における **DEG**

図表 S15　**M1146** に **cAMP** を添加した際のトランスクリプトーム解析における **DEG**

図表 S16　**S15** における **DEG (0h vs 2h)** に対する **GSEA** 解析結果のリスト

図表 S1 イオンペア LC-MS/MS における各代謝物の MRM トランシジョンおよび RT (相対定量用)

代謝物	親イオン	子イオン	確認親イオン	確認子イオン	RT (min)	CE	確認イオン CE
Lysine	145.1	97.05	145.1	99.05	1.275	13	17
Histidine	154.05	93	154.05	137.05	1.277	21	15
Serine	104.05	74.1	164.05	104	1.653	16	10
Asparagine	131.05	113.05	131.05	114.05	1.659	15	20
Glutamine	145.1	127.05	145.1	42.05	1.691	18	25
Threonine	118.05	74.05	178.05	118	1.702	16	15
Proline	174.05	114	114.05	68	1.898	10	15
Valine	176.05	116.05	116.05	45	2.201	10	16
Cytidine	302.05	242	242.05	109	2.337	10	15
Methionine	148.05	47.05	148.05	100	2.767	14	12
Guanine	150.05	133.05	150.05	66	3.126	21	32
Hypoxanthine	135.05	92	135.05	65	3.546	28	30
Tyrosine	180.05	163.05	180.05	119.05	3.554	18	18
Adenine	134.1	107.05	134.1	92	3.589	22	21
Isoleucine	190.05	130.05	261.1	130.05	3.638	10	9
Leucine	190.05	130.05	261.1	130.05	3.963	10	9
Xanthine	151.05	108.05	151.05	80.05	3.978	18	28
Glutamate	146.05	102.05	146.05	128.05	4.284	15	17
Uridine	243.05	110.05	303.05	243	4.325	17	10
Aspartate	132.05	88.05	132.05	115	4.426	14	16
Inosine	267.05	135.05	267.05	108	4.566	23	42
Thymine	125.05	42	185.05	125.05	4.575	18	10
Guanosine	282.1	150.05	282.1	133.05	4.605	21	36
Urate	167.1	124.05	167.1	96	4.699	15	19
Adenosine	266.1	134.05	266.1	107.05	4.975	25	31
Glycerate	105.05	75.05	105.05	87.05	5.097	13	8
Thymidine	301.1	241	241.05	42	5.151	10	17

Phenylalanine	164.05	147.05	164.05	103	5.208	18	18
Glycolate	75.05	47.05	135.05	75	5.335	13	10
Pyroglutamate	188.05	128	128.05	84.05	6.618	12	13
Tryptophan	203.1	116.05	203.1	74	6.675	18	18
R5P	229.05	97	229.05	79.05	6.691	13	40
Lactate	89.05	43	89.05	45.05	6.779	14	13
S7P	289.1	97	289.1	79.05	6.803	21	47
NAD+	662.1	540.1	662.1	159	7.188	18	45
GAP	169.05	97	169.05	79.05	7.288	12	30
Orotate	155.05	111.05	155.05	42	7.301	14	26
CMP	322.1	79.05	322.1	97	7.488	28	22
MEP	215.05	79.05	431.1	215	7.623	27	19
F1P	259.05	97	259.05	79.05	7.651	17	28
Pyruvate	87.05	43	147.05	87	7.782	11	9
R1P	229.05	79.05	229.05	211.05	7.812	25	10
UMP	323.1	79.05	323.1	97	7.951	36	27
GMP	362.1	79.05	362.1	97	8.031	26	29
IMP	347.05	79.05	347.05	135	8.049	40	28
DHAP	169.05	97	169.05	79.05	8.085	12	30
TMP	321.1	195.05	321.1	79.05	8.572	20	35
AMP	346.1	79.05	346.1	97	8.618	38	26
Pantothenate	218.05	88	218.05	146.05	8.814	17	16
Nicotinate	122.05	78	122.05	51	8.818	16	33
cAMP	328.1	134.05	328.1	79.05	9.143	27	40
Succinate	117.05	73	117.05	99.05	9.568	15	15
Malate	133.05	115	133.05	71.05	9.848	17	15
UDP-Glc	565.05	323.05	565.05	97	9.878	27	46
XMP	363.1	211.05	363.1	151.05	9.961	20	27
CDP	402.1	79.05	402.1	159.05	10.021	42	30
2OG	145.1	101.05	145.1	57	10.046	10	13
Fumarate	115.05	71	175.05	115	10.128	10	10
GDP	442.1	79.05	442.1	159.05	10.131	45	24

6PGA	275.05	177.05	275.05	97	10.154	16	17
UDP	403.1	159	403.1	79.05	10.176	28	48
3PGA+2PGA	185.05	97	185.05	79.05	10.181	16	32
Shikimate-3P	253.05	97	253.05	235.05	10.224	13	12
NADH	664.1	79.05	664.1	346.1	10.238	57	35
NADP+	742.1	620.1	742.1	159.05	10.329	18	45
ADP	426.1	79.05	426.1	134.05	10.353	46	28
Citrate	191.05	87	191.05	111.05	10.399	18	15
FBP	339.05	97	339.05	241.05	10.423	18	19
PEP	167.05	79.05	335.1	167.05	10.477	15	12
Isocitrate	191.05	73	191.05	111.05	10.568	22	15
FMN	455.1	97	455.1	79.05	10.593	27	42
2-Isopropylmalate	175.05	115.05	175.05	113.05	10.603	18	18
GTP	522.1	159	522.1	424.05	10.706	33	23
CTP	482.1	159	482.1	79.05	10.729	36	46
UTP	483.1	159	483.1	79.05	10.759	36	49
ATP	506.1	159	506.1	408.1	10.801	40	26
FAD	784.1	346.1	784.1	97	10.863	37	48
PRPP	389.1	177.05	389.1	291.05	10.948	21	14
NADPH	744.1	159.05	744.1	408.1	10.976	49	45
PQQ	329.1	241.05	329.1	197.05	11.051	15	23
CoA	766.1	408.1	766.1	79.05	11.105	30	54
3HB CoA	852.1	772.1	852.1	408.1	11.109	41	45
IPP,DMAPP	245.05	79.05	245.05	227.05	11.123	27	12
Malonyl CoA	852.1	808.1	852.1	408.1	11.125	27	40
Acetyl CoA	808.1	408.1	808.1	159.05	11.147	37	30
Succinyl CoA	866.1	408.1	866.1	786.1	11.149	44	40
Crotonyl CoA	834.1	408.1	834.1	159	11.299	36	54
Butyryl CoA	836.1	408.1	836.1	159	11.373	37	53
methylmalonyl-CoA	866.1	822.05	866.1	408	11.149	25	41
(+)-10-Camphorsulfonic acid	231.1	80			11.055	32	

図表 S2 糖リン酸分析における MRM トランシジョンおよび RT (相対定量用)

代謝物	親 イオン	子 イオン	RT (min)	親 確認イオン	子 確認イオン	CE	確認イオン CE
G6P	259.05	97	9.8	259.05	79.05	17	28
F6P	259.05	97	10.65	259.05	79.05	17	28
G1P	259.05	79	11	259.05	79.05	28	17
Ru5P	229.05	97	12.1	229.05	79.05	13	27
Xu5P	229.05	97	11.8	229.05	79.05	13	27
(+)-10-Camphorsulfonic acid	231.1	80	30.031			32	

図表 S3 PFPP カラムを用いた LC-MS/MS 分析系における各代謝物の MRM トランシジョンおよび RT (相対定量用)

代謝物	親イオン	子イオン	確認親イオン	確認子イオン	RT (min)	CE	確認イオン CE
Cystine	241.05	152.1	241.05	120.1	2.32	-13	-20
Asparagine	133.05	74	133.05	87.1	2.28	-16	-13
Glycine	76.05	30.05	76.05	47.05	2.6	-13	-12
Alanine	90	44.05	90	45.05	2.55	-14	-33
Citrulline	176.05	70.05	176.05	159.1	2.63	-26	-11
Betaine	118.05	58.05	118.05	59.05	2.67	-27	-22
Proline	116	70.05	116	43.05	3	-17	-31
Ornithine	133.05	70	133.05	116.05	3.01	-18	-14
Lysine	147.05	84.1	147.05	130.1	3.26	-17	-10
Uracil	113.05	70	113.05	96.1	3.51	-12	-17
Arginine	175.05	70.1	175.05	116	3.93	-23	-15
2-Aminobutyrate	104.05	58	104.05	41.05	3.28	-13	-23
Cytosine	112.05	95	112.05	40.1	4.79	-24	-37
Thymine	127.05	54.05	127.05	84.1	6.8	-29	-19
SAM	399.05	250.1	399.05	298.1	9.28	-17	-14
Adenine	136.05	119.05	136.05	65.05	9.19	-25	-43
Xanthosine	285.05	153.1	285.05	133.05	10.64	-11	-14
Adenosine	268.05	136.1	268.05	119	11.45	-18	-49
SAH	385.1	136.1	385.1	134.05	12.99	-20	-23
Gluconate	195.05	75	195.05	129	1.555	17	13
(+)-10-Camphorsulfonic acid	231.05	80			11.055	32	

図表 S4 各代謝物の略称

代謝物	略称
SAM	S-adenosyl-methionine
SAH	S-adenosyl-homocysteine
G6P	Glucose 6-phosphate
F6P	Fructose 6-phosphate
G1P	Glucose 1-phosphate
Ru5P	Ribulose 5-phosphate
Xu5P	Xylurose 5-phosphate
R5P	Ribose 5-phosphate
S7P	Sedoheptulose 7-phosphate
F1P	Fructose 1-phosphate
R1P	Fructose 1-phosphate
GAP	Glyceraldehyde 3-phosphate
DHAP	Dihydroxy acetone phosphate
6PGA	6-phospho gluconate
3PGA	Glycererate 3-phosphate
2PGA	Glycerate 2-phosphate
FBP	Fructose 1,6-bisphosphate
PEP	Phosphoenolpyruvate
2OG	2-oxogluconate
MEP	2-C-methylerythritol 4-phosphate
CMP	Cytidine monophosphate
UMP	Uridine monophosphate
GMP	Guanosine monophosphate
IMP	Inosine monophosphate
TMP	Thymidine monophosphate
AMP	Adenosine monophosphate
cAMP	cyclic AMP
XMP	Xanthosine monophosphate
CDP	Cytidine diphosphate
GDP	Guanosine diphosphate
UDP	Uridine diphosphate
ADP	Adenosine di phosphate
UDP-Glc	UDP-glucose

GTP	Guanosine triphosphate
CTP	Cytidine triphosphate
UTP	Uridine triphosphate
ATP	Adenosine triphosphate
FMN	Flavin mononucleotide
FAD	Flavin adenine dinucleotide
PRPP	Phospho ribose pyrophosphate
NAD+	Nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized)
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)
NADP+	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)

図表 S5 イオンペア LC-MS/MS における各代謝物の MRM トランシジョン (絶対定量)

代謝物	親イオン	子イオン	RT (min)	CE
Histidine	154	93	1.277	21
Histidine_13C	160	98	1.277	21
4-Aminobutyrate	162	102	1.465	8
4-Aminobutyrate_13C	166	106	1.465	8
Serine	104	74.05	1.653	16
Serine_13C	107	76.05	1.653	16
Asparagine	131.05	113.05	1.659	15
Asparagine_13C	135.05	117.05	1.659	15
Glutamine	145	127.05	1.691	18
Glutamine_13C	150	132.05	1.691	18
Threonine	118	74.05	1.702	16
Threonine_13C	122	76.05	1.702	16
Valine	176.1	116.05	2.201	10
Valine_13C	181.1	121.05	2.201	10
Cytidine	302	242	2.337	10
Cytidine_13C	311	251	2.337	10
Methionine	148	47.05	2.767	14
Methionine_13C	153	48.05	2.767	14
Guanine	150	133.05	3.126	21
Guanine_13C	155	138.05	3.126	21
Hypoxanthine	135.05	92	3.546	28
Hypoxanthine_13C	140.05	96	3.546	28
Tyrosine	180	163.05	3.554	18
Tyrosine_13C	189	172.05	3.554	18
Isoleucine	190.05	130.05	3.638	10
Isoleucine_13C	196.05	136.05	3.638	10
Leucine	190.05	130.05	3.963	10
Leucine_13C	196.05	136.05	3.963	10
Xanthine	151.05	108.05	3.978	18

Xanthine_13C	156.05	112.05	3.978	18
Glutamate	146	102.05	4.284	15
Glutamate_13C	151	106.05	4.284	15
Uridine	243	110.05	4.325	17
Uridine_13C	252	114.05	4.325	17
Aspartate	132	88.05	4.426	14
Aspartate_13C	136	91.05	4.426	14
Inosine	267	135.05	4.566	23
Inosine_13C	277	140.05	4.566	23
Thymine	125.05	42	4.575	18
Thymine_13C	130.05	43	4.575	18
Guanosine	282.1	150.05	4.605	21
Guanosine_13C	292.1	155.05	4.605	21
Urate	167.1	124.05	4.699	15
Urate_13C	172.1	128	4.699	15
Thymidine	301.1	241	5.151	10
Thymidine_13C	311.1	251	5.151	10
Phenylalanine	164	147.05	5.208	18
Phenylalanine_13C	173	156.05	5.208	18
Glycolate	75	47.05	5.335	13
Glycolate_13C	77	48.05	5.335	13
Pyroglutamate	188	128	6.618	12
Pyroglutamate_13C	193	133	6.618	12
Tryptophan	203.1	116.05	6.675	18
Tryptophan_13C	214.1	124.05	6.675	18
R5P	229.05	97	6.691	13
R5P_13C	234.05	97	6.691	13
Lactate	89	43	6.779	14
Lactate_13C	92	45	6.779	14
S7P	289.1	97	6.803	21
S7P_13C	296.1	97	6.803	21
NAD+	662.1	540.1	7.188	18

NAD+_13C	683.1	555.1	7.188	18
GAP	169	97	7.288	12
GAP_13C	172	97	7.288	12
Orotate	155.05	111.05	7.301	14
Orotate_13C	160.05	115.05	7.301	14
Ru5P	229.05	97	7.459	13
Ru5P_13C	234.05	97	7.459	13
CMP	322.1	79	7.488	28
CMP_13C	331.1	79	7.488	28
F1P	259.05	97	7.651	17
F1P_13C	265.05	97	7.651	17
Pyruvate	87.05	43.2	7.782	11
Pyruvate_13C	90.05	45.2	7.782	11
R1P	229.05	79	7.812	25
R1P_13C	234.05	79	7.812	25
UMP	323.1	79	7.951	36
UMP_13C	333.1	79	7.951	36
GMP	362.1	79	8.031	26
GMP_13C	372.1	79	8.031	26
IMP	347.05	79	8.049	40
IMP_13C	357.05	79	8.049	40
DHAP	169.05	97	8.085	12
DHAP_13C	172.05	97	8.085	12
TMP	321.1	195.05	8.572	20
TMP_13C	331.1	200.05	8.572	20
AMP	346.1	79	8.618	38
AMP_13C	356.1	79	8.618	38
Nicotinate	122	78	8.818	16
Nicotinate_13C	128	83	8.818	16
Pantothenate	218.05	88	8.818	17
Pantothenate_13C	227.05	91	8.818	17
cAMP	328.1	134.05	9.143	27

cAMP_13C	338.1	139.05	9.143	27
Succinate	117	73	9.568	15
Succinate_13C	121	76	9.568	15
Malate	133.05	115	9.848	17
Malate_13C	137.05	119	9.848	17
UDP-Glu	565.05	323.05	9.878	27
UDP-Glu_13C	580.05	332.05	9.878	27
XMP	363.1	211.05	9.961	20
XMP_13C	373.1	216.05	9.961	20
CDP	402.1	79	10.021	42
CDP_13C	411.1	79	10.021	42
2-Oxoglutarate	145.05	101.05	10.046	10
2-Oxoglutarate_13C	150.05	105.05	10.046	10
Fumarate	115.05	71	10.128	10
Fumarate_13C	119.05	74	10.128	10
GDP	442.1	79	10.131	45
GDP_13C	452.1	79	10.131	45
6-Phosphogluconate	275.05	97	10.154	17
6-Phosphogluconate_13C	281.05	97	10.154	17
UDP	403.1	159	10.176	28
UDP_13C	413.1	159	10.176	28
3PGA	185.05	97	10.181	16
3PGA_13C	188.05	97	10.181	16
NADH	664.1	79	10.238	57
NADH_13C	685.1	79	10.238	57
NADP+	742.1	620.1	10.329	18
NADP+_13C	763.1	635.1	10.329	18
ADP	426.1	79.05	10.353	46
ADP_13C	436.1	79.05	10.353	46
Citrate	191.05	87	10.399	18
Citrate_13C	197.05	90	10.399	18
FBP	339.05	97	10.423	18

FBP_13C	345.05	97	10.423	18
Phosphoenolpyruvate	167.05	79	10.477	15
Phosphoenolpyruvate_13C	170.05	79	10.477	15
Isocitrate	191.05	73	10.568	22
Isocitrate_13C	197.05	76	10.568	22
2-Isopropylmalate	175.05	115.05	10.603	18
2-Isopropylmalate_13C	182.05	120.05	10.603	18
GTP	522.1	159	10.706	33
GTP_13C	531.1	159	10.706	33
CTP	482.1	159	10.729	36
CTP_13C	491.1	159	10.729	36
UTP	483.1	159	10.759	36
UTP_13C	492.1	159	10.759	36
ATP	506.1	159	10.801	40
ATP_13C	516.1	159	10.801	40
FAD	784.1	346.1	10.863	37
FAD_13C	811.1	356.1	10.863	37
PRPP	389.1	177.05	10.948	21
PRPP_13C	394.1	177.05	10.948	21
NADPH	744.1	159.05	10.976	49
NADPH_13C	765.1	159.05	10.976	49
(+)-10-Camphorsulfonic acid (IS)	231.1	80	11.055	32
CoA	766.1	79	11.105	54
CoA_13C	787.1	79	11.105	54
Malonyl CoA	852.1	408.1	11.125	40
Malonyl CoA_13C	876.1	418.1	11.125	40
Acetyl CoA	808.1	408.1	11.147	37
Acetyl CoA_13C	831.1	418.1	11.147	37
Succinyl CoA	866.1	408.1	11.149	41
Succinyl CoA_13C	891.1	418.1	11.149	41
Crotonyl CoA	834.1	408.1	11.299	36
Crotonyl CoA_13C	859.1	418.1	11.299	36

Butyryl CoA	836.1	408.1	11.373	37
Butyryl CoA_13C	861.1	418.1	11.373	37

図表 S6 糖リン酸分析における各代謝物の MRM トランシジョン (絶対定量)

代謝物	親イオン	子イオン	RT (min)	CE
G6P	259.05	97	9.8	17
G6P_13C	265.05	97	9.8	17
F6P	259.05	97	10.65	17
F6P_13C	265.05	97	10.65	17
G1P	259.05	79	11	28
G1P_13C	259.05	79	11	28
(+)-10-Camphorsulfonic acid	231.1	80	30.031	32

図表 S7 PFPP カラムを用いた LC-MS/MS 分析系における各代謝物の MRM トランシジョン (絶対定量用)

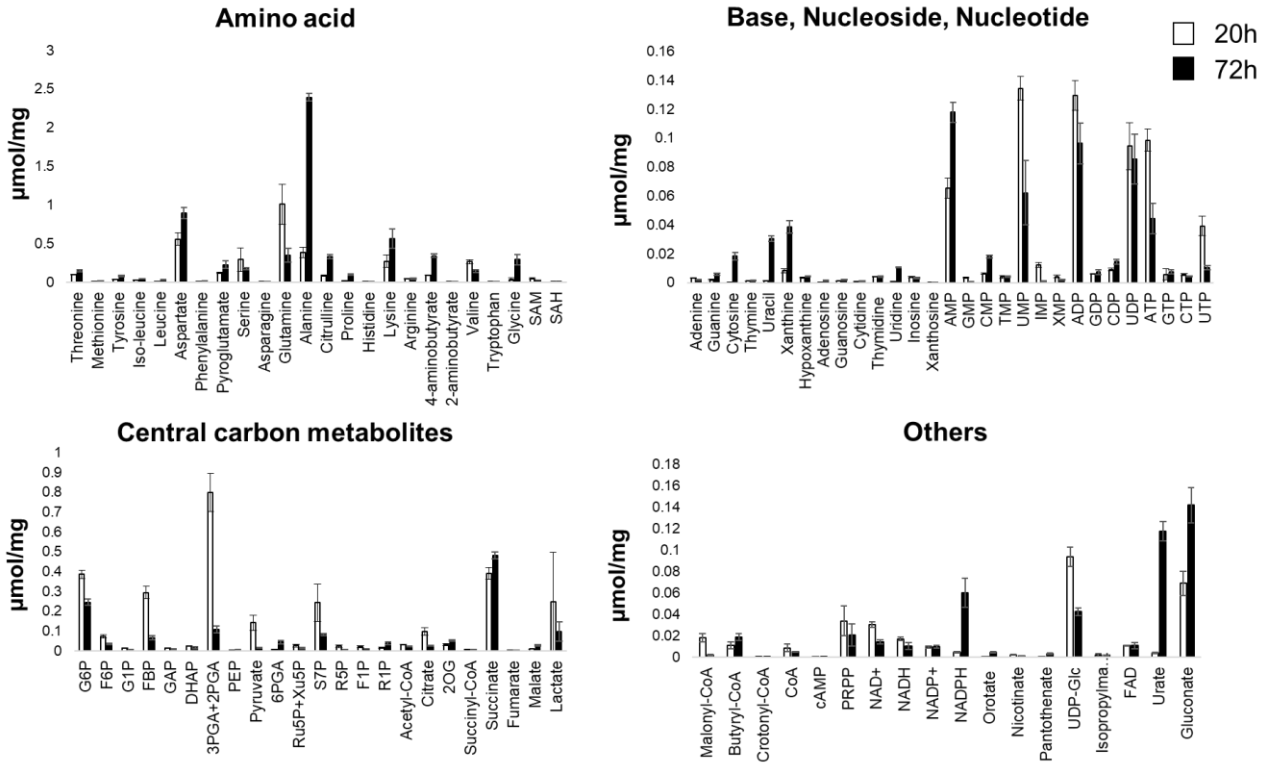
代謝物	親イオン	子イオン	RT (min)	CE
Gluconate	195.05	75	1.555	17
Gluconate_13C	201.05	77	1.555	17
Serine	106.05	60	2.08	-15
Serine_13C	109.05	62	2.08	-15
Asparagine	133.05	74	2.28	-16
Asparagine_13C	137.05	76	2.28	-16
Cystine	241.05	152.1	2.32	-13
Cystine_13C	247.05	155.1	2.32	-13
Alanine	90	44	2.55	-14
Alanine_13C	93	46	2.55	-14
Glycine	76.05	30.05	2.6	-13
Glycine_13C	78.05	31.05	2.6	-13
Citrulline	176.05	70.05	2.63	-26
Citrulline_13C	182.05	74.05	2.63	-26
Betaine	118.05	58.05	2.67	-27
Betaine_13C	123.05	61.05	2.67	-27
Proline	116	70.05	3	-17
Proline_13C	121	74.05	3	-17
Ornithine	133.05	70	3.01	-18
Ornithine_13C	138.05	74	3.01	-18
Lysine	147.05	84.1	3.26	-17
Lysine_13C	153.05	89.1	3.26	-17
2-Aminobutyrate	104.05	58	3.28	-13
2-Aminobutyrate_13C	108.05	61	3.28	-13
Uracil	113.05	70	3.51	-12
Uracil_13C	117.05	73	3.51	-12
Arginine	175.05	70.1	3.93	-23
Arginine_13C	181.05	74.1	3.93	-23
Cytosine	112.05	95	4.79	-24

Cytosine_13C	116.05	99	4.79	-24
Thymine	127.05	54.05	6.8	-29
Thymine_13C	132.05	57.05	6.8	-29
Adenine	136.05	119.05	9.19	-25
Adenine_13C	141.05	124.05	9.19	-25
SAM	399.05	250.1	9.28	-17
SAM_13C	414.05	260.1	9.28	-17
Xanthosine	285.05	153.1	10.64	-11
Xanthosine_13C	295.05	158.1	10.64	-11
(+)-10-Camphorsulfonic acid (IS)	231.05	80	11.055	32
Adenosine	268.05	136.1	11.45	-18
Adenosine_13C	278.05	141.1	11.45	-18
SAH	385.1	136.1	12.99	-20
SAH_13C	399.1	141.1	12.99	-20

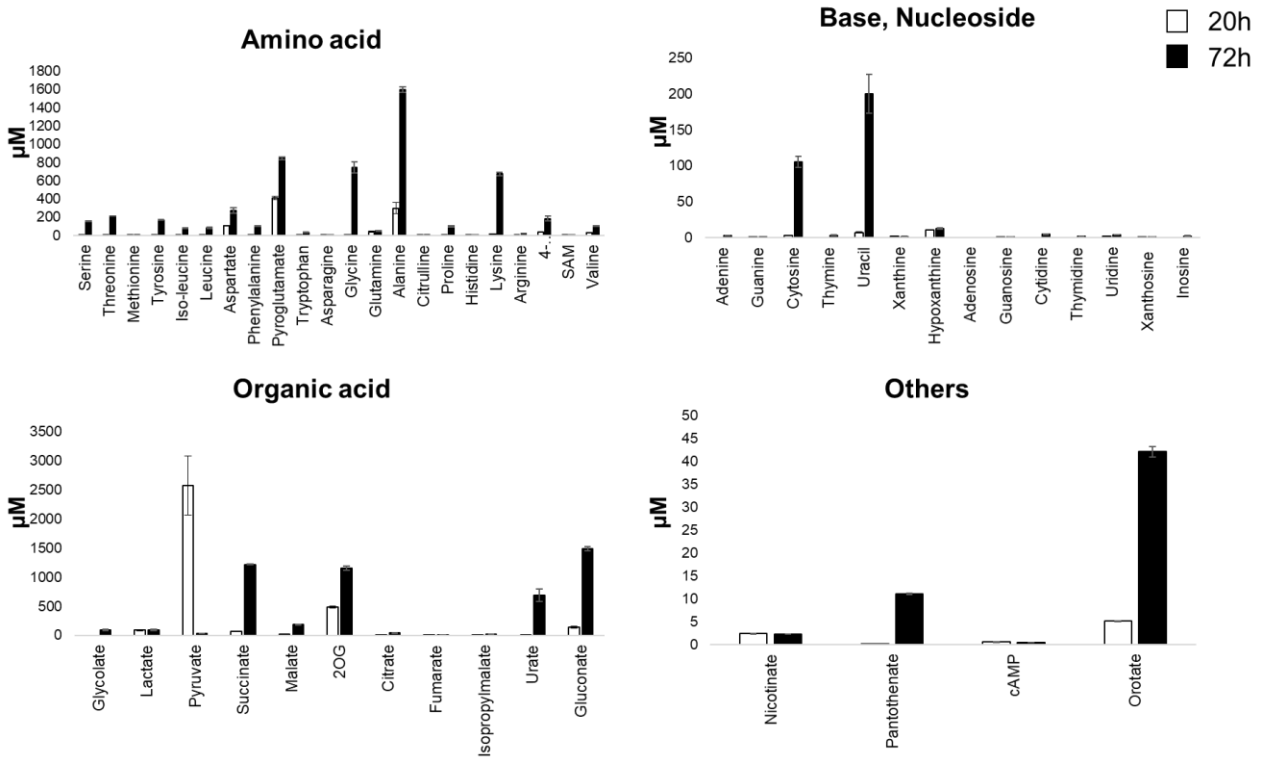
図表 S8 絶対定量データにおける代謝物の分類

	中央代謝	アミノ酸	核酸類	その他
細胞内	G6P	Threonine	Adenine	cAMP
	F6P	Methionine	Guanine	PRPP
	G1P	Tyrosine	Cytosine	NAD+
	FBP	Iso-leucine	Thymine	NADH
	GAP	Leucine	Uracil	NADP+
	DHAP	Aspartate	Xanthine	NADPH
	3PGA+2PGA	Phenylalanine	Hypoxanthine	Orotate
	PEP	Pyroglutamate	Adenosine	Nicotinate
	Pyruvate	Serine	Guanosine	Pantothenate
	6PGA	Asparagine	Cytidine	UDP-Glc
	Ru5P+Xu5P	Glutamine	Thymidine	Isopropylmalate
	S7P	Alanine	Uridine	FAD
	R5P	Citrulline	Inosine	Urate
	F1P	Proline	Xanthosine	Gluconate
	R1P	Histidine	AMP	
	Acetyl-CoA	Lysine	GMP	
	Citrate	Arginine	CMP	
	2OG	4-aminobutyrate	TMP	
	Succinyl-CoA	2-aminobutyrate	UMP	
	Succinate	Valine	IMP	
	Fumarate	Tryptophan	XMP	
	Malate	Glycine	ADP	
	Lactate	SAM	GDP	
		SAH	CDP	
		Glutamate	UDP	
			ATP	
			GTP	
			CTP	
			UTP	

	有機酸	アミノ酸	核酸類	その他
細胞外	Glycolate	Serine	Adenine	Nicotinate
	Lactate	Threonine	Guanine	Pantothenate
	Pyruvate	Methionine	Cytosine	cAMP
	Succinate	Tyrosine	Thymine	Orotate
	Malate	Iso-leucine	Uracil	
	2OG	Leucine	Xanthine	
	Citrate	Aspartate	Hypoxanthine	
	Fumarate	Phenylalanine	Adenosine	
	Isopropylmalate	Pyroglutamate	Guanosine	
	Urate	Tryptophan	Cytidine	
	Gluconate	Asparagine	Thymidine	
		Glycine	Uridine	
		Glutamine	Xanthosine	
		Alanine	Inosine	
		Citrulline		
		Proline		
		Histidine		
		Lysine		
		Arginine		
		4-aminobutyrate		
		SAM		
		Valine		
		Glutamate		



図表 S9 M1146 株における細胞内代謝物の絶対濃度 (µmol/mg)



図表 S10 M1146 株における細胞外代謝物の絶対濃度 (µM)

図表 S11 代謝物の絶対濃度データおよび各代謝物の添加回収率

細胞内代謝物

代謝物 (μmol/mg)	平均値		標準偏差		回収率(%)
	20h	72h	20h	72h	
Threonine	9.66E-02	1.44E-01	4.25E-03	1.29E-02	88.4
Methionine	9.32E-03	1.77E-02	8.27E-04	1.68E-03	104.0
Tyrosine	3.39E-02	7.88E-02	4.97E-03	6.48E-03	104.7
Iso-leucine	2.48E-02	4.53E-02	2.72E-03	2.26E-03	88.0
Leucine	1.18E-02	2.98E-02	1.06E-03	2.58E-03	86.4
Aspartate	5.57E-01	8.95E-01	7.95E-02	7.10E-02	89.0
Phenylalanine	9.67E-03	1.83E-02	6.50E-04	2.22E-03	98.1
Pyroglutamate	1.24E-01	2.25E-01	8.86E-03	4.84E-02	93.6
Serine	2.90E-01	1.73E-01	1.54E-01	1.60E-02	96.9
Asparagine	6.41E-03	3.21E-03	4.22E-04	1.39E-03	99.3
Glutamine	1.01E+00	3.48E-01	2.61E-01	9.29E-02	107.2
Alanine	3.85E-01	2.39E+00	6.86E-02	5.14E-02	96.1
Citrulline	8.35E-02	3.31E-01	1.19E-02	2.71E-02	90.0
Proline	1.54E-02	9.92E-02	2.12E-03	7.03E-03	108.2
Histidine	8.39E-03	3.17E-03	5.50E-04	5.02E-04	86.4
Lysine	2.71E-01	5.60E-01	7.94E-02	1.26E-01	80.2
Arginine	4.09E-02	4.50E-02	4.01E-03	1.12E-02	105.7
4-aminobutyrate	9.22E-02	3.43E-01	1.92E-03	1.89E-02	103.7
2-aminobutyrate	3.54E-03	4.39E-03	4.70E-04	1.65E-04	91.4
Valine	2.64E-01	1.41E-01	2.89E-02	1.79E-02	70.5
Tryptophan	6.26E-03	9.48E-03	2.46E-04	5.60E-04	98.5
Glycine	3.54E-02	2.90E-01	1.89E-02	6.56E-02	87.7
SAM	4.61E-02	2.29E-02	6.48E-03	1.28E-03	105.9
SAH	2.64E-03	8.50E-04	4.06E-04	2.05E-04	106.7
Glutamate	2.79E+01	2.14E+01	1.33E+00	1.65E+00	93.2
G6P	3.87E-01	2.46E-01	2.06E-02	1.68E-02	117.2
F6P	7.27E-02	3.38E-02	8.86E-03	3.33E-03	108.4
G1P	1.47E-02	6.25E-03	8.02E-04	7.18E-04	101.3

FBP	2.94E-01	6.64E-02	3.04E-02	1.04E-02	98.3
GAP	1.51E-02	8.16E-03	6.81E-04	2.14E-03	104.9
DHAP	2.52E-02	1.54E-02	1.59E-03	6.25E-03	107.5
3PGA+2PGA	7.99E-01	1.09E-01	9.55E-02	1.87E-02	100.3
PEP	4.93E-03	7.01E-03	1.03E-03	1.69E-03	80.3
Pyruvate	1.42E-01	1.59E-02	3.79E-02	9.53E-04	81.6
6PGA	5.91E-03	4.50E-02	1.49E-03	9.25E-03	101.2
Ru5P+Xu5P	2.74E-02	1.42E-02	7.19E-03	2.90E-03	77.0
S7P	2.44E-01	8.16E-02	9.38E-02	5.96E-03	93.0
R5P	2.30E-02	7.02E-03	5.77E-03	7.94E-04	86.7
F1P	2.12E-02	1.16E-02	4.07E-03	5.03E-04	107.4
R1P	1.62E-02	3.98E-02	2.28E-03	7.16E-03	100.8
Acetyl-CoA	3.25E-02	2.46E-02	7.46E-04	1.78E-03	105.5
Citrate	9.84E-02	2.47E-02	2.03E-02	1.76E-03	80.1
2OG	3.18E-02	5.30E-02	5.61E-03	3.48E-03	101.0
Succinyl-CoA	8.82E-03	4.97E-03	1.78E-03	7.63E-04	87.1
Succinate	3.91E-01	4.80E-01	2.91E-02	1.80E-02	85.7
Fumarate	2.92E-03	3.95E-03	1.07E-03	2.39E-04	100.3
Malate	9.06E-03	2.87E-02	1.69E-03	3.89E-03	105.9
Lactate	2.48E-01	9.86E-02	2.48E-01	4.89E-02	97.4
Malonyl-CoA	1.83E-02	2.21E-03	3.62E-03	6.58E-04	97.7
Butyryl-CoA	1.13E-02	1.88E-02	3.08E-03	3.25E-03	89.4
Crotonyl-CoA	3.02E-04	3.57E-04	3.57E-05	9.45E-05	91.8
CoA	8.97E-03	5.19E-03	3.68E-03	5.01E-04	73.3
cAMP	6.39E-04	3.00E-04	1.15E-04	3.71E-05	90.2
PRPP	3.40E-02	2.07E-02	1.37E-02	1.03E-02	79.6
NAD+	3.05E-02	1.48E-02	2.49E-03	1.95E-03	98.1
NADH	1.73E-02	1.09E-02	1.59E-03	3.29E-03	93.8
NADP+	9.83E-03	9.70E-03	1.11E-03	1.32E-03	95.7
NADPH	4.84E-03	6.03E-02	8.81E-04	1.37E-02	81.2
Orotate	7.95E-04	5.00E-03	8.31E-05	6.05E-04	106.2
Nicotinate	2.53E-03	1.40E-03	2.85E-04	4.72E-05	109.1

Pantothenate	8.36E-04	3.50E-03	1.56E-04	4.04E-04	94.9
UDP-Glc	9.39E-02	4.28E-02	9.09E-03	3.55E-03	98.5
Isopropylmalate	2.48E-03	1.97E-03	1.25E-03	1.45E-04	101.8
FAD	1.10E-02	1.10E-02	3.12E-04	2.72E-03	100.3
Urate	4.38E-03	1.18E-01	7.12E-04	8.97E-03	54.3
Gluconate	6.89E-02	1.42E-01	1.11E-02	1.64E-02	89.7
Adenine	3.26E-03	1.97E-03	8.83E-05	1.82E-04	78.6
Guanine	2.02E-03	5.80E-03	3.59E-04	5.63E-04	74.7
Cytosine	3.20E-04	1.83E-02	2.41E-05	2.61E-03	65.7
Thymine	1.13E-03	1.56E-03	5.37E-05	9.59E-05	83.7
Uracil	1.29E-03	3.06E-02	2.69E-04	1.82E-03	94.0
Xanthine	8.30E-03	3.85E-02	1.50E-03	4.41E-03	103.3
Hypoxanthine	3.48E-03	4.55E-03	5.61E-04	3.01E-04	89.0
Adenosine	2.59E-04	1.60E-03	1.01E-04	3.52E-04	101.7
Guanosine	1.10E-03	1.89E-03	4.01E-05	2.22E-04	94.8
Cytidine	9.08E-04	1.19E-03	1.64E-04	1.55E-04	102.6
Thymidine	4.22E-03	4.00E-03	2.28E-04	4.40E-04	102.3
Uridine	7.82E-04	1.06E-02	1.43E-04	4.10E-04	103.8
Inosine	3.92E-03	3.16E-03	3.83E-04	4.78E-04	102.3
Xanthosine	2.16E-04	3.12E-04	3.45E-05	2.57E-05	106.2
AMP	6.55E-02	1.18E-01	6.82E-03	7.07E-03	93.8
GMP	3.46E-03	6.66E-04	4.10E-04	5.79E-05	93.6
CMP	6.28E-03	1.81E-02	3.31E-04	7.65E-04	87.8
TMP	4.04E-03	4.15E-03	1.04E-03	3.00E-04	102.7
UMP	1.34E-01	6.21E-02	8.10E-03	2.22E-02	105.4
IMP	1.24E-02	8.98E-04	1.52E-03	2.15E-04	88.9
XMP	4.40E-03	2.19E-03	9.87E-04	2.11E-04	86.5
ADP	1.29E-01	9.63E-02	1.03E-02	1.40E-02	85.0
GDP	6.22E-03	7.35E-03	1.53E-04	1.73E-03	83.4
CDP	9.08E-03	1.44E-02	1.04E-03	1.88E-03	97.6
UDP	9.44E-02	8.54E-02	1.61E-02	1.72E-02	109.8
ATP	9.86E-02	4.44E-02	7.84E-03	1.04E-02	88.0

GTP	5.73E-03	7.51E-03	3.78E-03	1.47E-03	90.0
CTP	5.46E-03	4.46E-03	7.48E-04	3.66E-04	86.9
UTP	3.91E-02	1.03E-02	6.71E-03	1.42E-03	94.0

細胞外代謝物

代謝物 (μM)	平均値		標準偏差		回収率(%)
	20h	72h	20h	72h	
Serine	4.21	156.75	0.22	2.45	105.9
Threonine	5.48	212.07	0.21	2.92	89.3
Methionine	1.30	1.57	0.08	0.04	86.2
Tyrosine	1.63	167.91	0.12	5.03	101.1
Iso-leucine	3.92	80.86	0.63	4.53	92.8
Leucine	4.16	79.74	0.31	9.02	80.4
Aspartate	101.83	271.31	4.22	31.39	78.7
Phenylalanine	1.72	98.59	0.12	2.70	98.9
Pyroglutamate	407.72	843.27	20.70	15.50	78.6
Tryptophan	1.10	31.89	0.05	2.45	85.6
Asparagine	0.67	7.15	0.21	1.06	106.0
Glycine	9.44	744.93	3.84	59.54	104.8
Glutamine	39.02	50.50	9.32	4.87	90.4
Alanine	296.59	1598.26	60.95	33.56	105.3
Citrulline	1.33	1.73	0.01	0.15	85.5
Proline	3.39	95.53	0.68	7.19	112.7
Histidine	1.19	3.72	0.07	0.36	87.5
Lysine	14.24	672.99	1.62	17.40	91.8
Arginine	3.74	21.41	0.08	2.60	87.4
4-aminobutyrate	33.09	184.38	1.32	24.37	100.6
SAM	0.79	4.38	0.07	0.52	100.9
Valine	27.04	102.30	2.24	4.91	106.1
Glutamate	256159.68	77022.91	10892.99	667.30	91.4
Adenine	0.00	3.29	0.00	0.03	92.8

Guanine	0.06	0.09	0.01	0.01	100.5
Cytosine	2.57	105.56	0.53	7.64	56.6
Thymine	0.00	3.16	0.00	0.31	86.0
Uracil	6.98	199.85	1.14	26.97	76.6
Xanthine	1.66	1.34	0.22	0.16	91.3
Hypoxanthine	10.78	12.91	0.13	1.00	88.0
Adenosine	0.00	0.00	0.00	0.00	95.1
Guanosine	0.10	0.54	0.00	0.02	111.4
Cytidine	0.00	4.61	0.00	0.26	63.6
Thymidine	0.00	2.15	0.00	0.05	90.7
Uridine	1.65	3.77	0.10	0.11	67.3
Xanthosine	0.32	0.84	0.11	0.03	106.7
Inosine	0.00	2.45	0.00	0.03	76.4
Glycolate	0.00	92.68	0.00	9.36	67.6
Lactate	86.85	94.50	10.97	9.28	108.6
Pyruvate	2571.85	31.60	511.70	1.13	105.8
Succinate	65.85	1217.56	3.62	4.92	91.9
Malate	24.53	181.35	0.97	4.86	93.4
2OG	484.66	1150.05	14.21	39.03	85.5
Citrate	4.43	40.03	0.60	2.41	100.5
Fumarate	12.67	9.14	1.12	0.25	76.5
Isopropylmalate	3.75	20.62	0.25	0.16	97.4
Urate	4.64	691.16	0.11	108.65	69.5
Gluconate	137.94	1486.12	14.71	39.57	86.8
Nicotinate	2.38	2.33	0.04	0.00	88.7
Pantothenate	0.08	11.11	0.01	0.11	103.8
cAMP	0.55	0.47	0.00	0.00	96.1
Orotate	5.10	42.15	0.12	1.12	105.7

図表 S12 M1146, M1146+ACT の経時変化トランスクリプトーム解析における DEG

	Locus_tag	Log2 fold-change	FDR	product
Upregulated	SCO0320	5.399	4.16E-72	hypothetical protein
	SCO4266	4.506	7.47E-105	oxidoreductase
	SCO1909	4.213	1.35E-105	hypothetical protein
	SCO2478	4.142	6.90E-71	reductase
	SCO1178	4.044	2.56E-119	hypothetical protein
	SCO0321	3.346	8.67E-64	carboxylesterase
	SCO4265	2.997	1.45E-73	transport integral membrane protein
	SCO7008	2.828	6.99E-48	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO2477	2.465	1.36E-23	short chain dehydrogenase
	SCO5285	1.765	2.90E-16	ATP-dependent protease
	SCO4280	1.709	8.75E-28	reductase
	SCO5163	1.676	2.09E-08	hypothetical protein
	SCO0379	1.653	2.83E-11	catalase
	SCO0224	1.651	1.93E-23	hypothetical protein
	SCO2695	1.589	1.01E-25	hypothetical protein
	SCO0380	1.565	8.07E-13	hypothetical protein
	SCO2027	1.412	1.78E-15	hypothetical protein
	SCO3206	1.397	1.56E-16	transmembrane efflux protein
	SCO6810	1.325	4.80E-08	hypothetical protein
	SCO2476	1.302	3.84E-08	dehydrogenase/reductase
	SCO0888	1.298	4.59E-07	hypothetical protein
	SCO1366	1.188	6.56E-11	hypothetical protein
	SCO1802	1.177	2.18E-12	two-component system sensor kinase
	SCO4174	1.153	2.80E-02	hypothetical protein
	SCO4279	1.125	7.91E-13	acetyltransferase
	SCO1176	1.080	3.01E-11	dihydroxy-acid dehydratase
	SCO4983	1.035	2.11E-05	hypothetical protein
	SCO3207	1.028	6.76E-06	TetR family transcriptional regulator
	SCO6811	1.023	5.73E-05	hypothetical protein
	SCO1801	0.994	4.47E-09	two component response regulator
	SCO1661	0.991	1.72E-02	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
	SCO1044	0.953	3.72E-02	hypothetical protein

	SCO2309	0.940	7.51E-11	transmembrane transport protein
	SCO1245	0.894	3.57E-04	adenosylmethionine--8-amino-7-oxononanoate aminotransferase BioA
	SCO7536	0.874	9.13E-06	hypothetical protein
	SCO4336	0.855	3.29E-06	marR-family protein
	SCO3366	0.851	2.87E-08	exporter
	SCO1145	0.826	6.34E-12	MarR family regulatory protein
	SCO6694	0.824	1.54E-06	transcriptional regulator
	SCO5485	0.814	9.26E-03	small hydrophobic membrane protein
	SCO1814	0.813	5.27E-06	enoyl-ACP reductase
	SCO6692	0.809	2.88E-04	hypothetical protein
	SCO0999	0.807	9.81E-04	superoxide dismutase
	SCO1089	0.803	9.41E-07	hypothetical protein
	SCO0955	0.797	1.07E-02	hypothetical protein
	SCO4587	0.791	2.11E-05	hypothetical protein
	SCO7305	0.779	6.95E-04	hypothetical protein
	SCO1046	0.758	2.44E-02	metal transporter ATPase
	SCO1803	0.757	4.86E-03	oxidoreductase
	SCO1304	0.753	8.18E-08	hypothetical protein
	SCO3694	0.740	2.03E-02	transcriptional regulator
	SCO1244	0.736	4.37E-03	biotin synthase
	SCO6520	0.732	2.86E-03	RNA polymerase sigma factor
	SCO2937	0.712	5.62E-03	transmembrane transport protein
	SCO2696	0.711	9.81E-04	2-hydroxyacid dehydrogenase
	SCO1550	0.709	1.88E-03	small membrane protein
	SCO1247	0.709	6.28E-06	hypothetical protein
	SCO5484	0.705	3.50E-02	small hydrophobic membrane protein
	SCO4337	0.702	9.57E-05	integral membrane efflux protein
	SCO5031	0.698	5.59E-04	hypothetical protein
	SCO6693	0.686	4.10E-04	hypothetical protein
	SCO0887	0.684	1.67E-04	TetR family transcriptional regulator
	SCO5032	0.684	6.18E-04	alkyl hydroperoxide reductase
	SCO0885	0.683	9.76E-13	thioredoxin
	SCO3800	0.682	2.66E-02	acyl-CoA dehydrogenase
	SCO6828	0.678	1.11E-06	hypothetical protein
	SCO2634	0.667	6.68E-03	hypothetical protein
	SCO5206	0.663	1.60E-04	hydrogen peroxide sensitive repressor

	SCO7314	0.661	3.30E-04	RNA polymerase sigma factor
	SCO1804	0.655	1.22E-02	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase
	SCO2763	0.650	1.54E-02	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO1905	0.648	3.92E-02	hypothetical protein
	SCO1246	0.643	2.54E-02	dithiobiotin synthetase
	SCO5490	0.641	1.69E-04	hypothetical protein
	SCO0463	0.639	1.24E-04	hypothetical protein
	SCO4297	0.639	2.03E-02	oxidoreductase
	SCO4501	0.631	1.43E-04	3-ketoacyl-ACP reductase
	SCO5535	0.630	2.46E-04	carboxyl transferase
	SCO2498	0.624	7.03E-03	efflux protein
	SCO1084	0.620	5.89E-04	thioredoxin
	SCO5536	0.616	6.68E-03	hypothetical protein
	SCO5042	0.614	4.66E-09	fumarate hydratase
	SCO3111	0.612	1.54E-02	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO3286	0.609	5.59E-04	hypothetical protein
	SCO0973	0.605	1.43E-05	hypothetical protein
	SCO1997	0.600	1.86E-05	hypothetical protein
	SCO1144	0.597	2.90E-05	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO7784	0.596	2.73E-04	oxidoreductase
	SCO3110	0.567	3.50E-02	ABC transporter
	SCO6354	0.567	1.90E-03	two-component regulator
	SCO2816	0.554	1.23E-02	hypothetical protein
	SCO7226	0.546	1.99E-03	hypothetical protein
	SCO6515	0.535	4.88E-02	protease
	SCO6127	0.533	5.62E-03	carboxylesterase
	SCO1243	0.529	2.66E-02	8-amino-7-oxononanoate synthase
	SCO4956	0.520	2.35E-03	methionine sulfoxide reductase A
	SCO2745	0.514	4.57E-02	LacI family transcriptional regulator
	SCO5191	0.511	1.72E-02	hypothetical protein
	SCO0917	0.507	2.30E-02	oxygenase
	SCO7442	0.507	1.57E-02	hypothetical protein
Downregulated	SCOt14	-0.508	4.73E-02	tRNA-Ala
	SCO4744	-0.531	1.64E-02	4'-phosphopantetheinyl transferase
	SCO4949	-0.560	1.90E-02	nitrate reductase subunit delta NarJ3
	SCO6296	-0.567	3.10E-03	hypothetical protein

	SCOt59	-0.577	6.16E-03	tRNA-Gln
	SCO1684	-0.578	2.06E-02	hypothetical protein
	SCO4748	-0.603	4.39E-02	hypothetical protein
	SCO1334	-0.608	4.70E-02	hypothetical protein
	SCO0141	-0.678	4.55E-03	calcium-binding protein
	SCO6992	-0.749	3.68E-02	regulatory protein
	SCO1368	-0.755	1.11E-02	ABC transporter
	SCO6886	-0.775	3.55E-02	hypothetical protein
	SCOt65	-0.804	1.82E-07	tRNA-Pro
	SCOt63	-0.812	2.52E-12	tRNA-Pro
	SCOt64	-0.856	4.47E-10	tRNA-Pro

図表 S13 S12 における DEG に対する GSEA 解析結果のリスト

Class	Gene set	Gene list
Biological process	biotin biosynthetic process	SCO1246
	(p-value: 1.10E-03)	SCO1245
		SCO1244
	oxidation-reduction process	SCO6811
	(p-value: 7.80E-03)	SCO1084
		SCO4297
		SCO0885
		SCO6828
	magnesium ion transport	SCO6692
	(p-value: 4.10E-02)	SCO0973
	transmembrane transport	SCO3366
	(p-value: 5.00E-02)	SCO4265
		SCO2309
		SCO2937
		SCO2498
		SCO3206
	cell redox homeostasis	SCO5032
	(p-value: 5.60E-02)	SCO1084
		SCO0885
	cellular response to oxidative stress	SCO1084
	(p-value: 6.70E-02)	SCO0885
	sulfate assimilation	SCO1084
	(p-value: 8.00E-02)	SCO0885
Pathway	biotin metabolism	SCO1246
	(p-value: 6.30E-08)	SCO1245
		SCO1244
		SCO4501
		SCO1814
		SCO1243
Keywords	biotin biosynthesis	SCO1246
	(p-value: 4.30E-04)	SCO1245
		SCO1244
	oxidoreductase	SCO0999
	(p-value: 6.00E-02)	SCO2696
		SCO5031

		SCO4956
		SCO1814
		SCO3800
		SCO0379
	S-adenosyl-L-methionine	SCO1245
	(p-value: 6.70E-02)	SCO1804
		SCO1244

図表 S14 M145 に cAMP を添加した際のトランスクリプトーム解析における DEG

	Locus_tag	log2 FoldChange	FDR	Product
Upregulated	SCO5086	1.612	1.01E-03	ketoacyl reductase
	SCO1803	1.601	1.64E-02	oxidoreductase
	SCO4468	1.400	1.83E-03	hypothetical protein
	SCO1804	1.350	1.54E-02	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase
	SCO7665	1.331	8.43E-04	hypothetical protein
	SCO5267	1.211	1.15E-02	hypothetical protein
	SCO2265	1.082	3.94E-02	hypothetical protein
	SCO6632	1.068	6.29E-04	hypothetical protein
	SCO1421	1.041	7.20E-03	hypothetical protein
	SCO1470	1.030	2.66E-02	hypothetical protein
	SCOs02	0.974	7.20E-03	Note=ssrA gene coding for tmRNA%2C 397 bp%3B similar to SW:MT10SARNA (EMBL:X60301) Mycobacterium tuberculosis gene for 10Sa RNA%2C 606 bp%3B
	SCO3663	0.952	6.29E-04	hypothetical protein
	SCO5085	0.947	4.09E-02	actinorhodin operon activator protein
	SCO3273	0.901	2.20E-02	hypothetical protein
	SCO3929	0.881	2.56E-02	hypothetical protein
	SCO4340	0.818	2.56E-02	integrase
	SCO3579	0.706	4.92E-02	regulatory protein
	SCO1784	0.676	4.89E-02	hypothetical protein
Downregulated	SCO1116	-0.663	3.84E-02	hypothetical protein
	SCO4294	-0.724	4.80E-02	hypothetical protein
	SCOt06	-0.817	4.59E-02	tRNA-Val
	SCO1523	-0.868	1.01E-03	pyridoxal biosynthesis lyase PdxS
	SCO2146	-0.889	9.85E-03	aminotransferase
	SCOt55	-0.959	4.80E-02	tRNA-Arg

図表 S15 M1146 に cAMP を添加した際のトランスクリプトーム解析における DEG

0h-2h

	Locus_tag	log2 fold-change	FDR	Product
Upregulated	SCO4225	4.268802	4.93E-46	hypothetical protein
	SCO7460	3.870598	3.11E-37	lipoprotein
	SCO7461	3.448306	1.80E-31	hydrolase
	SCO6682	3.397151	7.68E-30	hypothetical protein
	SCO1700	3.385493	6.03E-59	hypothetical protein
	SCO4425	3.286517	2.16E-26	sigma-like protein
	SCO1773	3.249582	4.44E-40	L-alanine dehydrogenase
	SCO7613	3.216213	4.51E-32	hypothetical protein
	SCO4224	3.122607	3.95E-35	hypothetical protein
	SCO1699	3.107479	7.63E-54	transcriptional regulator
	SCO0607	2.878871	1.46E-18	lipoprotein
	SCO7612	2.784227	1.48E-30	hypothetical protein
	SCO6729	2.757481	2.62E-26	hypothetical protein
	SCO1698	2.58548	9.71E-34	hypothetical protein
	SCO4924	2.575861	3.47E-15	hypothetical protein
	SCO4011	2.272175	4.92E-17	hypothetical protein
	SCO3900	2.13079	2.96E-11	hypothetical protein
	SCO0608	2.129755	1.26E-15	regulatory protein
	SCOt05	2.106527	1.16E-03	tRNA-Val
	SCO1550	2.100474	4.84E-07	small membrane protein
	SCO6728	2.02151	7.42E-03	hypothetical protein
	SCO2113	2.008261	9.64E-12	bacterioferritin
	SCOt40	1.918938	2.34E-05	tRNA-Gly
	SCO5436	1.878173	2.09E-20	sodium:dicarboxylate symporter
	SCO4683	1.858371	3.74E-18	glutamate dehydrogenase
	SCO4979	1.840807	2.49E-15	phosphoenolpyruvate carboxykinase
	SCO0609	1.826778	4.25E-10	hypothetical protein
	SCO6429	1.781823	1.09E-12	hypothetical protein
	SCO4635	1.761568	1.23E-05	50S ribosomal protein L33
	SCO6431	1.761275	1.35E-18	peptide synthase
	SCO6681	1.758479	3.47E-15	Ser/Thr protein kinase
	SCO0736	1.737275	2.57E-06	hypothetical protein

	SCOt59	1.718141	4.64E-08	tRNA-Gln
	SCO6434	1.689358	3.47E-15	oxidoreductase
	SCO6433	1.689342	7.44E-17	hypothetical protein
	SCO3097	1.673448	2.85E-14	hypothetical protein
	SCO4784	1.646582	2.09E-11	hypothetical protein
	SCO2100	1.627741	3.41E-08	transcriptional regulator
	SCO7511	1.600463	6.24E-10	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
	SCO6436	1.579918	9.40E-14	tRNA synthetase
	SCO3924	1.543849	2.09E-06	hypothetical protein
	SCO5521	1.53667	9.93E-11	hypothetical protein
	SCO6435	1.517707	3.99E-03	hypothetical protein
	SCO5679	1.504608	1.62E-10	aldehyde dehydrogenase
	SCOt50	1.494434	3.04E-05	tRNA-Met
	SCO3111	1.454898	1.62E-10	ABC transporter ATP-binding protein
	SCOt51	1.451563	1.08E-03	tRNA-Trp
	SCO4492	1.42468	2.30E-07	octaprenyl carboxylase
	SCO3289	1.422715	5.18E-16	large membrane protein
	SCO3899	1.401718	4.64E-08	hypothetical protein
	SCO6432	1.39317	1.31E-13	peptide synthase
	SCO3194	1.39213	1.17E-07	lipoprotein
	SCO3356	1.384343	2.84E-05	ECF sigma factor
	SCO5783	1.381447	2.74E-05	hypothetical protein
	SCO3167	1.350914	6.60E-09	TetR family transcriptional regulator
	SCO6430	1.32058	1.36E-08	hypothetical protein
	SCO3327	1.313757	5.20E-04	hypothetical protein
	SCOt58	1.302183	1.51E-03	tRNA-Glu
	SCO3290	1.30145	1.11E-11	hypothetical protein
	SCOt48	1.300241	1.83E-03	tRNA-Tyr
	SCO2917	1.294454	4.79E-07	nicotinate phosphoribosyltransferase
	SCO3288	1.289339	2.19E-11	hypothetical protein
	SCO3328	1.284374	5.68E-04	hypothetical protein
	SCO4371	1.279278	4.86E-07	hypothetical protein
	SCO4908	1.273806	1.05E-08	RNA polymerase sigma factor
	SCO1563	1.268036	1.72E-04	acetyltransferase
	SCO3105	1.25621	1.48E-08	hypothetical protein
	SCO5676	1.252771	1.11E-11	4-aminobutyrate aminotransferase
	SCO3714	1.249471	4.71E-05	transposase

	SCO3342	1.234117	1.45E-07	glycine-rich hypothetical protein
	SCO5862	1.227405	6.65E-07	two-component regulator CutR
	SCO3862	1.226094	3.76E-03	hypothetical protein
	SCO5157	1.221153	2.87E-06	metal-transport protein
	SCO5610	1.216817	1.64E-03	hypothetical protein
	SCO1174	1.213397	2.22E-06	aldehyde dehydrogenase
	SCO5782	1.205692	1.99E-05	transmembrane transport protein
	SCO2066	1.181556	3.99E-04	hypothetical protein
	SCO4002	1.180065	8.26E-08	hypothetical protein
	SCO0703	1.176685	6.00E-04	regulator
	SCO0955	1.167057	1.49E-04	hypothetical protein
	SCO2457	1.164014	1.15E-05	lipoprotein
	SCOt11	1.162557	1.32E-03	tRNA-Met
	SCO5797	1.158786	9.73E-05	hypothetical protein
	SCO2546	1.153891	5.89E-07	adenosine deaminase
	SCO3977	1.153317	2.26E-05	protease
	SCO2947	1.152469	6.81E-03	hypothetical protein
	SCO3613	1.151831	3.27E-04	RNA polymerase sigma factor
	SCO1645	1.14839	6.94E-03	hypothetical protein
	SCO6683	1.147794	3.49E-07	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO5047	1.147497	1.62E-04	fructose 1%2C6-bisphosphatase II
	SCO1643	1.141117	4.39E-03	20S proteasome alpha-subunit
	SCO1793	1.124369	1.57E-04	hypothetical protein
	SCOr09	1.114252	6.94E-03	16S ribosomal RNA
	SCO5169	1.098247	1.48E-02	ATP-binding protein
	SCO4710	1.098211	1.05E-02	50S ribosomal protein L29
	SCO4923	1.094574	7.13E-04	hypothetical protein
	SCO1710	1.094024	1.36E-07	integral membrane transport protein
	SCO5724	1.093316	2.91E-03	hypothetical protein
	SCO4187	1.091317	1.52E-04	hypothetical protein
	SCO0735	1.089292	7.21E-06	oxidoreductase
	SCO5230	1.086772	8.28E-03	hypothetical protein
	SCO4651	1.084175	6.08E-05	lipoprotein
	SCO4783	1.082797	9.79E-05	hypothetical protein
	SCO5393	1.072674	4.35E-04	ABC transporter ATP-binding protein
	SCOt56	1.071584	1.78E-02	tRNA-Gln
	SCO1839	1.070556	4.84E-03	transcriptional regulator

	SCO6091	1.069547	2.49E-06	hypothetical protein
	SCOs01	1.069146	1.20E-02	ribonuclease P RNA
	SCO6715	1.067552	3.19E-02	transcriptional regulator
	SCO3357	1.061488	6.10E-05	hypothetical protein
	SCO5660	1.053593	8.26E-08	peptidase
	SCO3110	1.052863	1.14E-05	ABC transporter
	SCO3034	1.049396	6.94E-03	sporulation regulatory protein
	SCO5464	1.047168	1.65E-03	hypothetical protein
	SCO4424	1.041991	2.94E-06	hypothetical protein
	SCO5148	1.040423	3.02E-04	hypothetical protein
	SCO1875	1.038561	9.83E-06	penicillin binding protein
	SCO2628	1.030828	4.98E-04	amino acid permease
	SCO4317	1.030174	2.73E-03	hypothetical protein
	SCO1562	1.02911	1.17E-04	hypothetical protein
	SCO7646	1.025533	2.18E-02	hypothetical protein
	SCO3396	1.023308	2.30E-06	hypothetical protein
	SCO5195	1.022157	9.77E-04	hypothetical protein
	SCO1965	1.018369	1.37E-03	export associated protein
	SCO1638	1.017089	1.58E-02	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
	SCO3870	1.010125	1.12E-02	hypothetical protein
	SCO4137	1.004392	5.12E-03	hypothetical protein
	SCO4903	1.004367	4.39E-05	hypothetical protein
	SCO5663	1.001972	8.40E-03	hypothetical protein
	SCO5863	1.000496	1.79E-04	two-component sensor (kinase)
	SCO1940	0.999305	3.01E-04	hypothetical protein
	SCO2648	0.995574	6.81E-03	hypothetical protein
	SCOt31	0.98968	1.33E-02	tRNA-Leu
	SCO1385	0.987642	4.17E-03	hypothetical protein
	SCO5537	0.987164	2.73E-03	ATP/GTP binding protein
	SCO1375	0.986699	6.01E-03	hypothetical protein
	SCO1548	0.986581	5.12E-03	hypothetical protein
	SCO2078	0.983954	9.25E-03	hypothetical protein
	SCO2505	0.977474	4.29E-06	ABC-transporter metal-binding lipoprotein
	SCO5664	0.976657	1.25E-03	hypothetical protein
	SCO5145	0.976222	3.39E-02	hypothetical protein
	SCO5570	0.97038	1.06E-02	hypothetical protein
	SCO4725	0.970265	1.11E-02	translation initiation factor IF-1

	SCO5798	0.965272	1.24E-03	hypothetical protein
	SCO4223	0.962988	3.59E-08	AraC family transcription regulator
	SCO4037	0.959077	1.15E-02	small membrane protein
	SCO0209	0.954496	6.86E-04	hypothetical protein
	SCO6592	0.950267	6.51E-03	hypothetical protein
	SCO4088	0.949882	1.84E-02	hypothetical protein
	SCO3546	0.945176	5.38E-03	hypothetical protein
	SCO4847	0.944654	1.74E-03	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
	SCO0462	0.940064	2.35E-03	oxidoreductase
	SCO6773	0.939216	5.47E-06	peptidase
	SCO1964	0.938612	3.58E-03	export associated protein
	SCO5720	0.933486	3.58E-03	hypothetical protein
	SCO2258	0.932825	3.01E-04	ABC transporter
	SCO3397	0.931783	1.00E-04	integral membrane lysyl-tRNA synthetase
	SCO5856	0.931701	4.55E-04	hypothetical protein
	SCO3974	0.931569	9.93E-04	hypothetical protein
	SCO1440	0.930911	1.61E-02	6%2C7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
	SCO3909	0.930116	2.73E-02	50S ribosomal protein L9
	SCO4493	0.929633	3.84E-04	transcription regulator AsnC
	SCO1644	0.928834	1.07E-02	20S proteasome subunit beta
	SCO1470	0.924989	6.95E-03	hypothetical protein
	SCO0268	0.924309	3.22E-02	hypothetical protein
	SCO2456	0.922756	5.39E-04	hypothetical protein
	SCO2918	0.918224	1.65E-03	nicotinamidase
	SCO5568	0.914919	3.92E-03	phosphopantetheine adenylyltransferase
	SCO1777	0.913662	1.00E-04	hypothetical protein
	SCO3713	0.913393	1.00E-02	hypothetical protein
	SCO5839	0.912824	7.73E-04	hypothetical protein
	SCO2899	0.912693	1.97E-02	GroES family molecular chaperone
	SCO4584	0.912051	1.28E-03	hypothetical protein
	SCO7322	0.911638	2.50E-02	anti-sigma factor
	SCO1941	0.911361	1.24E-04	hypothetical protein
	SCO3579	0.90764	2.51E-02	regulatory protein
	SCO5725	0.905451	1.02E-02	hypothetical protein
	SCO5358	0.904316	1.73E-05	hypothetical protein
	SCO4713	0.904183	3.41E-02	50S ribosomal protein L24
	SCO5147	0.90332	1.89E-04	RNA polymerase sigma factor SigE

	SCO6671	0.895753	3.99E-04	hypothetical protein
	SCO3146	0.89483	1.14E-03	hypothetical protein
	SCO6008	0.894318	8.02E-03	transcriptional repressor protein
	SCO1944	0.890875	3.02E-02	preprotein translocase subunit SecG
	SCO7042	0.890422	1.48E-02	MarR family transcriptional regulator
	SCO4524	0.888925	4.91E-03	hypothetical protein
	SCO3712	0.888754	4.40E-04	hydrolase
	SCO3911	0.887112	1.02E-04	replicative DNA helicase
	SCO2224	0.886775	1.12E-02	hypothetical protein
	SCO7393	0.884327	4.01E-05	lipoprotein
	SCO1602	0.883529	4.99E-03	hypothetical protein
	SCO5413	0.882814	9.49E-03	MarR-transcriptional regulator
	SCO2257	0.882145	3.01E-04	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO5742	0.881002	1.85E-02	hypothetical protein
	SCO6225	0.878917	1.20E-03	hypothetical protein
	SCO1691	0.877157	5.13E-03	TetR family transcriptional regulator
	SCO4884	0.87409	2.16E-04	lipoprotein
	SCO1950	0.873415	1.33E-02	hypothetical protein
	SCO5545	0.87242	2.41E-02	hypothetical protein
	SCO2303	0.871461	2.10E-02	hypothetical protein
	SCO3880	0.870431	1.66E-02	50S ribosomal protein L34
	SCO1963	0.869756	4.97E-04	integral membrane export protein
	SCO7615	0.868608	7.25E-04	DNA-binding protein
	SCO3881	0.868508	2.53E-02	ribonuclease P component
	SCO4228	0.865243	8.18E-03	phosphate transport system regulator
	SCO6437	0.862492	1.01E-07	hypothetical protein
	SCO5197	0.86179	3.81E-03	hypothetical protein
	SCO1319	0.859962	1.77E-02	hypothetical protein
	SCO4652	0.85892	3.88E-02	50S ribosomal protein L10
	SCO1543	0.857554	6.46E-03	hypothetical protein
	SCO2668	0.852316	1.14E-03	hypothetical protein
	SCO3761	0.852184	9.38E-03	hypothetical protein
	SCO4716	0.84966	2.83E-02	30S ribosomal protein S8
	SCO2097	0.848708	4.81E-02	hypothetical protein
	SCO1749	0.846225	1.33E-02	hypothetical protein
	SCO6760	0.845884	1.33E-02	phytoene synthase
	SCO4791	0.845867	1.62E-04	two-component system sensor kinase

	SCO6268	0.843992	1.35E-02	histidine kinase
	SCO3906	0.842258	3.32E-02	30S ribosomal protein S6
	SCO4798	0.84104	3.09E-03	peptidase
	SCO2579	0.840003	7.08E-03	nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase
	SCO2458	0.83923	8.09E-03	hypothetical protein
	SCO4736	0.839035	4.68E-03	phosphoglucosamine mutase
	SCO2041	0.837669	2.15E-02	hypothetical protein
	SCO4895	0.83701	6.42E-03	RNA polymerase factor sigma-70
	SCO1600	0.836894	4.63E-02	translation initiation factor IF-3
	SCO2167	0.835168	9.38E-03	hypothetical protein
	SCO5481	0.833656	4.93E-04	hypothetical protein
	SCO1320	0.833041	1.47E-03	hypothetical protein
	SCO1082	0.832364	2.67E-02	electron transfer flavoprotein subunit beta
	SCO4226	0.832336	1.24E-03	hypothetical protein
	SCO3086	0.830791	2.41E-04	lipoprotein
	SCO5733	0.828333	3.00E-02	hypothetical protein
	SCO2663	0.827567	2.21E-03	hypothetical protein
	SCO5151	0.824827	1.46E-02	hypothetical protein
	SCO2807	0.824511	2.50E-03	hypothetical protein
	SCO6722	0.823809	1.33E-02	regulator
	SCO5112	0.822456	4.79E-03	ABC transporter integral membrane protein BldKA
	SCO0596	0.820126	1.54E-02	DNA-binding protein
	SCO4885	0.818309	3.40E-03	lipoprotein
	SCO3884	0.817313	3.15E-02	hypothetical protein
	SCO5869	0.816639	3.02E-02	hypothetical protein
	SCO1114	0.815028	1.84E-02	uracil-DNA glycosylase
	SCO6493	0.810639	3.62E-02	hypothetical protein
	SCO0323	0.810305	2.31E-04	hypothetical protein
	SCO5244	0.809426	2.01E-02	anti-sigma factor
	SCO1514	0.80905	3.06E-02	adenine phosphoribosyltransferase
	SCO4227	0.808777	2.77E-02	hypothetical protein
	SCO2949	0.807902	5.49E-03	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase
	SCOs02	0.806989	2.11E-02	Note=ssrA gene coding for tmRNA%2C 397 bp%3B similar to SW:MT10SARNA (EMBL:X60301) Mycobacterium tuberculosis gene for 10Sa RNA%2C 606 bp%3B
	SCO5492	0.80573	1.68E-02	short chain dehydrogenase

	SCO3575	0.802873	2.22E-02	hypothetical protein
	SCO3202	0.802629	9.76E-04	RNA polymerase principal sigma factor
	SCO4091	0.802285	4.04E-02	DNA-binding protein
	SCO6224	0.800557	9.13E-03	hypothetical protein
	SCO4506	0.798919	7.79E-03	hypothetical protein
	SCO4684	0.797934	1.45E-02	cold shock protein
	SCO3180	0.796522	3.67E-02	molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaC
	SCO5459	0.796441	3.14E-03	enoyl-CoA hydratase
	SCO7536	0.79458	8.43E-03	hypothetical protein
	SCO4686	0.794226	4.14E-02	hypothetical protein
	SCO2582	0.792697	1.11E-02	hypothetical protein
	SCO3811	0.79216	1.32E-04	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
	SCO3074	0.79205	2.91E-02	hypothetical protein
	SCO3958	0.791937	3.98E-03	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO4108	0.789926	1.12E-02	peptidase
	SCO6103	0.789871	2.45E-03	acetyltransferase
	SCO3612	0.789081	4.37E-04	hypothetical protein
	SCO3378	0.788588	9.65E-03	small membrane protein
	SCO5458	0.78727	2.94E-03	lipoprotein
	SCO2366	0.785655	1.43E-02	hypothetical protein
	SCO4737	0.783847	4.84E-03	hypothetical protein
	SCO0797	0.783698	6.40E-03	hypothetical protein
	SCO6618	0.782271	2.74E-02	hypothetical protein
	SCO4043	0.77911	3.49E-02	hypothetical protein
	SCO5562	0.779005	2.21E-02	thiamine monophosphate kinase
	SCO3925	0.776073	9.12E-05	transcriptional regulator
	SCO5732	0.774482	2.22E-02	hypothetical protein
	SCO5561	0.771992	1.13E-02	hypothetical protein
	SCO4585	0.770874	4.86E-03	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO3572	0.770844	1.80E-02	hydrolase
	SCO1755	0.769301	8.58E-03	hypothetical protein
	SCOr13, SCOr14, SCOr15	0.769171	3.67E-02	16S ribosomal RNA, 23S ribosomal RNA, 5S ribosomal RNA
	SCO5392	0.768937	3.31E-02	ABC transporter
	SCO1464	0.767658	2.73E-02	ribulose-phosphate 3-epimerase
	SCO2089	0.767515	1.15E-02	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2%2C6-

				diaminopimelate ligase
	SCO2339	0.767409	2.73E-02	hypothetical protein
	SCO3898	0.767162	2.41E-04	hypothetical protein
	SCO6031	0.765233	3.61E-02	uroporphyrinogen decarboxylase
	SCO6218	0.76459	1.36E-03	phosphatase
	SCO6621	0.764556	8.33E-04	hypothetical protein
	SCO5754	0.764002	3.44E-03	hypothetical protein
	SCO3844	0.76214	2.09E-02	hypothetical protein
	SCO5243	0.762039	1.65E-02	RNA polymerase sigma factor
	SCO1542	0.761953	6.94E-03	hypothetical protein
	SCO5265	0.759483	1.84E-03	hypothetical protein
	SCO1384	0.75913	3.64E-02	hypothetical protein
	SCO5044	0.758843	1.60E-02	fumarate hydratase class I
	SCOt24	0.758215	3.28E-02	tRNA-Leu
	SCO1720	0.757788	6.94E-03	ABC-transporter transmembrane protein
	SCO6589	0.756978	4.31E-02	elongation factor G
	SCO0695	0.756843	1.98E-02	hypothetical protein
	SCO2939	0.755898	9.87E-04	hypothetical protein
	SCO2162	0.754582	1.77E-02	quinolinate synthetase
	SCO3887	0.75232	4.31E-02	partitioning or sporulation protein
	SCO5784	0.751329	9.92E-04	two-component sensor
	SCO2067	0.74797	6.10E-03	hypothetical protein
	SCO1639	0.746069	2.53E-02	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
	SCO5504	0.745064	1.65E-02	hypothetical protein
	SCO3913	0.744599	2.18E-02	hypothetical protein
	SCO6139	0.744332	1.65E-02	sensor kinase
	SCO3358	0.744079	2.03E-02	two-component system response regulator
	SCO5143	0.7438	2.20E-02	DNA-3-methyladenine glycosylase I
	SCO3045	0.741533	1.70E-03	hypothetical protein
	SCO5556	0.741431	9.49E-03	histone-like DNA binding protein
	SCO1391	0.741358	3.23E-02	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase
	SCO1395	0.74105	3.03E-02	mutT-like protein
	SCO5875	0.741037	2.10E-02	potassium uptake protein
	SCO1540	0.74032	4.52E-02	hypothetical protein
	SCO5833	0.738778	2.36E-02	hypothetical protein
	SCO4005	0.737886	3.48E-03	RNA polymerase sigma factor
	SCO1462	0.736643	3.12E-02	hypothetical protein

	SCOr4, SCOr5, SCOr6	0.736391	4.96E-02	5S ribosomal RNA, 23S ribosomal RNA, 16S ribosomal RNA
	SCO4289	0.735768	2.49E-03	hypothetical protein
	SCO2942	0.733219	4.47E-02	oxidoreductase
	SCO5115	0.731374	2.36E-02	ABC transporter intracellular ATPase subunit BldKD
	SCO5285	0.731053	7.52E-06	ATP-dependent protease
	SCO7204	0.730683	3.56E-02	hypothetical protein
	SCO7477	0.730588	3.83E-03	hypothetical protein
	SCO2769	0.727915	7.50E-04	acetolactate synthase
	SCO0730	0.727823	4.14E-02	hypothetical protein
	SCO2903	0.72778	1.17E-02	hypothetical protein
	SCO2838	0.724099	6.94E-03	endoglucanase
	SCO6537	0.723524	3.41E-02	DNA-binding protein
	SCO4012	0.722328	2.54E-03	hypothetical protein
	SCO3145	0.721804	9.21E-03	hypothetical protein
	SCO1748	0.720058	9.20E-03	expression regulator
	SCO2730	0.719972	3.67E-02	regulator
	SCOr16, SCOr17, SCOr18	0.719485	4.78E-02	16S ribosomal RNA, 23S ribosomal RNA, 5S ribosomal RNA
	SCO7284	0.716372	4.80E-02	ribonuclease H
	SCO3044	0.715274	3.56E-03	hypothetical protein
	SCO1566	0.714814	3.67E-02	acyltransferase
	SCO3124	0.713471	5.00E-02	50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc
	SCO1526	0.71296	4.63E-02	lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase
	SCO4240	0.708745	1.11E-02	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO4439	0.707224	2.40E-02	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
	SCO3580	0.707067	3.04E-02	transpeptidase
	SCO5793	0.705827	3.77E-02	diaminopimelate epimerase
	SCO4790	0.705302	2.65E-04	hypothetical protein
	SCO5806	0.704034	3.49E-02	hypothetical protein
	SCO4980	0.701185	1.39E-03	hypothetical protein
	SCO4529	0.700468	2.65E-02	hypothetical protein
	SCO2019	0.700381	4.52E-02	chorismate mutase
	SCO3760	0.698188	5.20E-04	hypothetical protein
	SCO1806	0.697974	2.76E-02	ABC transporter ATP-binding protein

	SCO0763	0.697789	1.58E-02	oxidoreductase
	SCO6721	0.695891	5.90E-04	hypothetical protein
	SCO2999	0.694715	1.94E-02	hypothetical protein
	SCO5032	0.689686	4.61E-02	alkyl hydroperoxide reductase
	SCO2080	0.688	3.56E-02	hypothetical protein
	SCO5114	0.687703	1.43E-02	ABC transporter integral membrane protein BldKC
	SCO2069	0.687277	2.68E-02	hypothetical protein
	SCO5785	0.686697	8.96E-03	two-component regulator
	SCO1791	0.684795	3.56E-02	hypothetical protein
	SCO1767	0.684539	4.99E-02	DNA hydrolase
	SCO1165	0.68443	1.14E-02	hypothetical protein
	SCO5146	0.684293	4.43E-02	methyltransferase
	SCO2837	0.683878	2.57E-02	hypothetical protein
	SCO6723	0.68298	8.19E-03	oxidoreductase
	SCO2664	0.681599	1.73E-02	sugar-binding protein
	SCO5538	0.680709	4.05E-02	hypothetical protein
	SCO1138	0.678671	3.86E-03	hypothetical protein
	SCO3061	0.677343	3.41E-02	hypothetical protein
	SCO6528	0.675289	1.18E-05	integral membrane transport protein
	SCO4089	0.673192	1.54E-02	valine dehydrogenase
	SCO2116	0.672998	2.11E-02	hypothetical protein
	SCO5196	0.668086	9.65E-03	hypothetical protein
	SCO4330	0.667817	2.56E-02	hypothetical protein
	SCO0922	0.663784	2.15E-02	succinate dehydrogenase/fumarate reductase iron-sulfur subunit
	SCO3820	0.661626	3.67E-02	Ser/Thr protein kinase
	SCO5857	0.661571	1.73E-02	FAD-dependent oxidoreductase
	SCO5363	0.661338	3.77E-02	hypothetical protein
	SCO3959	0.661029	1.14E-03	hypothetical protein
	SCO2595	0.659063	3.77E-02	GTPase ObgE
	SCO2110	0.653661	3.94E-02	Ser/Thr protein kinase
	SCO3621	0.652895	1.04E-02	serine-threonine protein kinase
	SCO5555	0.652463	4.31E-02	hypothetical protein
	SCO4724	0.652236	3.91E-02	methionine aminopeptidase
	SCO7327	0.651555	7.82E-03	two-component system sensory histidine kinase
	SCO1870	0.650559	5.49E-03	hypothetical protein
	SCO6989	0.646528	1.37E-02	hypothetical protein

	SCO2061	0.646415	4.18E-02	ABC transport ATP-binding subunit
	SCO4590	0.644814	8.43E-03	hypothetical protein
	SCO2892	0.644652	1.14E-02	hypothetical protein
	SCO2088	0.644208	4.18E-02	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2%2C6-diaminopimelate- D-alanyl-alanyl ligase
	SCO1780	0.643117	3.12E-02	DNA repair protein
	SCO2183	0.642182	4.47E-02	2-oxoacid dehydrogenase subunit E1
	SCO5734	0.641942	4.73E-02	ATP/GTP binding protein membrane protein
	SCO2897	0.641449	4.28E-03	penicillin-binding protein
	SCO2316	0.641246	3.48E-02	hypothetical protein
	SCO6140	0.640827	1.36E-02	two-component system response regulator
	SCO7614	0.638683	4.24E-02	regulatory protein
	SCO4440	0.638565	3.09E-02	hypothetical protein
	SCO6973	0.638429	7.77E-03	hypothetical protein
	SCO3800	0.637902	2.17E-05	acyl-CoA dehydrogenase
	SCO1201	0.637473	2.91E-03	reductase
	SCO1349	0.635447	2.09E-02	hypothetical protein
	SCO0726	0.633556	3.66E-02	oxidoreductase
	SCO4184	0.633208	1.32E-02	aerial mycelium formation protein
	SCO2725	0.632198	4.76E-02	lipoprotein
	SCO3704	0.631695	1.35E-02	substrate-binding transport protein
	SCO6695	0.631259	4.33E-02	hypothetical protein
	SCO4869	0.630928	3.25E-02	methylmalonyl CoA mutase
	SCO5332	0.630834	4.45E-02	hypothetical protein
	SCO5386	0.629717	2.73E-02	anti-sigma factor antagonist
	SCO7060	0.62959	2.29E-02	hypothetical protein
	SCO5870	0.629205	3.28E-03	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO2455	0.628562	3.45E-03	spermidine synthase
	SCO1653	0.628409	3.02E-02	hypothetical protein
	SCO2960	0.628334	1.94E-02	hypothetical protein
	SCO5575	0.628142	1.14E-02	transmembrane protein
	SCO5191	0.627099	2.95E-02	hypothetical protein
	SCO3400	0.626773	2.63E-02	dihydroneopterin aldolase
	SCO3893	0.626055	4.31E-02	hypothetical protein
	SCO0851	0.625533	4.38E-02	PfkB-family carbohydrate kinase
	SCO3098	0.625328	4.73E-02	hypothetical protein
	SCO0729	0.622684	3.97E-02	hypothetical protein

	SCO0289	0.622001	1.25E-02	transcriptional regulator
	SCO7233	0.619518	3.33E-02	hypothetical protein
	SCO5721	0.618625	4.76E-02	hypothetical protein
	SCO1659	0.615798	2.79E-02	glycerol uptake facilitator protein
	SCO5563	0.615682	4.28E-02	phosphomethylpyrimidine kinase
	SCO2318	0.614147	6.94E-03	glycosyl transferase
	SCO3879	0.612435	3.56E-02	chromosomal replication initiation protein
	SCO7596	0.612429	1.17E-02	integral membrane transport protein
	SCO5659	0.612215	9.02E-03	hypothetical protein
	SCO4236	0.610931	4.02E-02	23S rRNA (guanosine(2251)-2'-O)-methyltransferase RlmB
	SCO4186	0.609441	6.94E-03	hypothetical protein
	SCO0230	0.607541	2.99E-02	TetR family transcriptional regulator
	SCO2193	0.605496	2.55E-02	lipoyltransferase
	SCO4779	0.605423	1.12E-02	Ser/Thr protein kinase
	SCO4172	0.603996	1.26E-02	hypothetical protein
	SCO7298	0.601723	3.17E-02	thioredoxin reductase
	SCO4438	0.599367	4.78E-02	hypothetical protein
	SCO5415	0.597117	4.93E-04	isobutyryl-CoA mutase A
	SCO2320	0.596123	2.09E-02	hypothetical protein
	SCO1996	0.595897	4.99E-02	dephospho-CoA kinase
	SCO4472	0.595154	4.05E-02	hypothetical protein
	SCO3956	0.594372	1.52E-02	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO5817	0.593763	1.75E-02	DNA hydrolase
	SCO5781	0.592544	2.75E-02	hypothetical protein
	SCO3048	0.586902	2.71E-02	hypothetical protein
	SCO2839	0.582331	1.46E-02	lipoprotein
	SCO5140	0.582023	2.23E-02	hypothetical protein
	SCO1827	0.581415	1.33E-02	DNA polymerase III subunit epsilon
	SCO3401	0.580976	1.32E-02	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridine diphosphokinase
	SCO3359	0.578621	3.21E-02	sensory histidine kinase contains hydrophobic membrane spanning regions
	SCO5138	0.578177	1.73E-02	hypothetical protein
	SCO7285	0.575444	2.40E-02	hydroxylase
	SCO4531	0.575152	4.24E-02	septum determining protein
	SCO0508	0.575025	2.40E-02	tetR family transcriptional regulator

	SCO1863	0.574382	2.69E-02	hypothetical protein
	SCO3885	0.57349	2.73E-02	16S rRNA methyltransferase GidB
	SCO5748	0.571361	3.70E-02	sensory histidine kinase
	SCO1779	0.56867	4.67E-02	hypothetical protein
	SCO4528	0.567608	1.06E-02	hypothetical protein
	SCO0954	0.566239	1.99E-03	acetyltransferase
	SCO2516	0.564364	9.46E-03	hypothetical protein
	SCO6776	0.559787	4.47E-02	hypothetical protein
	SCO2057	0.556164	4.53E-02	hypothetical protein
	SCO1169	0.556089	1.65E-02	xylose isomerase
	SCO3895	0.554187	4.68E-02	hypothetical protein
	SCO4042	0.553803	2.74E-02	hypothetical protein
	SCO0072	0.553664	1.55E-02	hypothetical protein
	SCO5657	0.553269	4.99E-02	aldehyde dehydrogenase
	SCO1323	0.552695	3.56E-02	hypothetical protein
	SCO4075	0.552116	8.58E-03	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO4904	0.550783	3.41E-02	hypothetical protein
	SCO0563	0.550338	3.30E-02	hypothetical protein
	SCO7439	0.550257	4.52E-02	hypothetical protein
	SCO2862	0.54968	4.73E-02	hypothetical protein
	SCO5179	0.5483	2.67E-02	peptidase
	SCO4566	0.547036	2.77E-02	NADH dehydrogenase subunit E
	SCO5257	0.54675	4.67E-02	methyltransferase
	SCO6005	0.546526	1.27E-02	lipoprotein
	SCO7824	0.546343	2.23E-02	TetR family transcriptional regulator
	SCO4118	0.544253	3.46E-02	TetR family transcriptional regulator
	SCO5190	0.544078	1.92E-02	DNA-binding protein
	SCO2863	0.541633	1.94E-02	helicase
	SCO1658	0.540508	1.54E-02	glycerol operon regulatory protein
	SCO1789	0.539349	1.78E-02	hypothetical protein
	SCO2494	0.53886	3.83E-03	pyruvate phosphate dikinase
	SCO4533	0.538416	3.16E-02	hypothetical protein
	SCO4782	0.536946	4.99E-02	hypothetical protein
	SCO6821	0.536057	1.77E-02	hypothetical protein
	SCO3106	0.533851	4.67E-02	lipoprotein
	SCO6045	0.53098	1.55E-02	hypothetical protein
	SCO3896	0.530016	4.61E-02	RNA nucleotidyltransferase

	SCO6020	0.528746	1.27E-02	transcriptional regulator
	SCO1211	0.528207	4.52E-02	polypeptide deformylase
	SCO2770	0.528084	2.73E-02	agmatinase
	SCO2726	0.523222	2.73E-02	methylmalonic acid semialdehyde dehydrogenase
	SCO2092	0.522862	4.38E-02	S-adenosyl-methyltransferase MraW
	SCO3868	0.522739	3.71E-02	hypothetical protein
	SCO1409	0.518042	4.14E-02	hypothetical protein
	SCO2665	0.517726	3.12E-02	hypothetical protein
	SCO5487	0.517406	3.40E-02	hypothetical protein
	SCO2004	0.51548	3.02E-02	formate dehydrogenase
	SCO4669	0.514442	1.86E-02	hypothetical protein
	SCO3046	0.513286	1.80E-02	hypothetical protein
	SCO3166	0.513221	2.43E-04	membrane transport protein
	SCO1709	0.513152	1.33E-02	integral membrane transport protein
	SCO1871	0.510908	4.76E-02	aldehyde dehydrogenase
	SCO0974	0.506307	1.84E-02	hypothetical protein
	SCO4752	0.505775	4.89E-02	DNA-binding/iron metalloprotein/AP endonuclease
	SCO3050	0.505671	4.52E-02	hypothetical protein
	SCO3286	0.504949	4.63E-02	hypothetical protein
	SCO2771	0.501474	3.44E-02	hypothetical protein
Downregulated	SCO4945	-0.50065	1.73E-02	dehydrogenase
	SCO0854	-0.50358	4.79E-02	hypothetical protein
	SCO6530	-0.50802	4.51E-02	hypothetical protein
	SCO6393	-0.51625	3.14E-03	transposase
	SCO2254	-0.51724	3.81E-02	transmembrane efflux protein
	SCO5009	-0.51822	1.55E-02	secretory protein
	SCO3540	-0.51875	4.52E-02	proteinase
	SCO3765	-0.52721	3.57E-02	hypothetical protein
	SCO4689	-0.52828	3.03E-02	hypothetical protein
	SCO2014	-0.53111	4.68E-02	pyruvate kinase
	SCO1575	-0.53572	1.65E-02	thiamine biosynthesis lipoprotein
	SCO6394	-0.54269	1.26E-02	IS element ATP binding protein
	SCO0783	-0.54322	1.44E-02	tetracycline resistance protein
	SCO0976	-0.54657	1.46E-02	hypothetical protein
	SCO0199	-0.54788	4.51E-02	alcohol dehydrogenase
	SCO2527	-0.54857	1.29E-02	hypothetical protein
	SCO0491	-0.54971	2.95E-02	ABC transporter

	SCO2649	-0.55065	3.09E-04	4-alpha-glucanotransferase
	SCO3383	-0.55584	2.23E-02	pantoate--beta-alanine ligase
	SCO5774	-0.55893	2.43E-02	glutamate permease
	SCO0588	-0.56313	1.27E-02	sensor kinase
	SCO6054	-0.56884	4.52E-02	transmembrane transport protein
	SCO6073	-0.57098	1.15E-02	cyclase
	SCO4242	-0.57131	2.73E-02	hypothetical protein
	SCO6149	-0.57164	1.05E-02	ribosome-associated GTPase
	SCO6222	-0.5745	6.94E-03	aminotransferase AlaT
	SCO2011	-0.57813	3.31E-02	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO2026	-0.57886	4.63E-02	glutamate synthase
	SCO7703	-0.5801	1.26E-02	integral membrane transport protein
	SCO4831	-0.58382	4.64E-04	glycine/betaine ABC transporter integral membrane protein
	SCO7517	-0.58793	3.94E-02	hypothetical protein
	SCO4679	-0.58866	1.77E-02	hypothetical protein
	SCO5451	-0.59653	5.97E-03	ABC transporter
	SCO1067	-0.59732	3.64E-02	integral membrane transport protein
	SCO5929	-0.59835	1.25E-02	oxidoreductase
	SCO7721	-0.60276	1.55E-03	hypothetical protein
	SCO4829	-0.6042	5.51E-03	oxidoreductase
	SCO0213	-0.60429	8.96E-03	nitrate/nitrite transporter
	SCO3814	-0.61431	3.59E-02	DNA-binding protein
	SCO1786	-0.61461	2.67E-02	iron-siderophore uptake system transmembrane protein
	SCO4501	-0.61889	3.56E-02	3-ketoacyl-ACP reductase
	SCO1396	-0.62296	1.84E-03	D-alanyl-D-alanine dipeptidase
	SCO1864	-0.62721	1.02E-02	acetyltransferase
	SCO5207	-0.62762	3.17E-02	hypothetical protein
	SCO3953	-0.63121	1.24E-03	RNA 2'-phosphotransferase-like protein
	SCO0216	-0.63447	5.31E-03	nitrate reductase subunit alpha NarG2
	SCO0273	-0.63863	3.15E-02	substrate binding protein
	SCO0149	-0.63904	1.81E-02	hypothetical protein
	SCO0488	-0.64234	9.86E-03	hydrolase
	SCO2765	-0.64282	6.94E-03	hypothetical protein
	SCO6529	-0.64396	1.33E-02	ATP/GTP binding protein
	SCO5250	-0.64423	3.08E-03	polyprenyl synthetase
	SCO2883	-0.64527	1.06E-02	cytochrome P450

	SCO2009	-0.64747	1.12E-02	branched-chain amino acid ABC transporter permease
	SCO3406	-0.65624	1.33E-02	hypothetical protein
	SCO6797	-0.65678	9.49E-03	ATP/GTP binding protein
	SCO1617	-0.65794	2.97E-02	hypothetical protein
	SCO5006	-0.67196	6.52E-04	septum site-determining protein
	SCO6660	-0.67796	1.15E-02	hypothetical protein
	SCO2655	-0.68313	1.36E-02	hypothetical protein
	SCO2781	-0.69042	5.33E-03	hypothetical protein
	SCO2528	-0.69248	1.77E-02	2-isopropylmalate synthase
	SCO0585	-0.69669	3.44E-03	ATP/GTP binding protein
	SCO0985	-0.69672	2.12E-04	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate/homocysteine S-methyltransferase
	SCO7699	-0.69726	2.12E-02	nucleotide-binding protein
	SCO0494	-0.70008	3.78E-02	iron-siderophore binding lipoprotein
	SCO1985	-0.7009	8.89E-03	hypothetical protein
	SCO1558	-0.70252	1.44E-03	ABC transporter permease
	SCO6055	-0.70493	1.25E-02	carbonic anhydrase
	SCO4245	-0.70627	1.96E-05	hypothetical protein
	SCO1567	-0.70836	2.22E-04	transmembrane-transport protein
	SCO6096	-0.70968	3.61E-02	lipoprotein
	SCO5404	-0.71315	1.51E-05	two-component sensor kinase
	SCO1374	-0.71572	3.17E-05	hypothetical protein
	SCO4854	-0.71981	9.50E-03	hypothetical protein
	SCO5221	-0.72878	3.11E-05	polypeptide deformylase
	SCO5174	-0.72888	7.13E-04	transferase
	SCO5292	-0.72924	1.19E-04	ATP/GTP-binding protein
	SCO0993	-0.73088	3.21E-04	hypothetical protein
	SCO0220	-0.73972	6.94E-03	hypothetical protein
	SCO0217	-0.74035	9.76E-04	nitrate reductase subunit beta NarH2
	SCO6102	-0.74873	2.60E-02	nitrite/sulfite reductase
	SCO0490	-0.75207	3.99E-04	esterase
	SCO5389	-0.75374	7.07E-03	hypothetical protein
	SCO1487	-0.75495	3.60E-04	aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit
	SCO3710	-0.75602	5.86E-03	large integral membrane protein
	SCO2384	-0.75661	8.96E-03	hypothetical protein
	SCO1134	-0.7575	1.91E-03	oxidoreductase%2C iron-sulfur binding subunit
	SCO7016	-0.76386	1.15E-04	LacI family transcriptional regulator

	SCO1132	-0.76531	1.47E-06	oxidoreductase
	SCO2010	-0.76792	5.70E-04	branched-chain amino acid ABC transporter permease
	SCO2716	-0.77354	3.54E-02	hypothetical protein
	SCO5405	-0.77465	1.14E-02	transcriptional regulator
	SCO0931	-0.77472	7.01E-05	proline-rich protein
	SCO1968	-0.77869	1.72E-03	hydrolase
	SCO4159	-0.78042	9.49E-03	transcriptional regulator
	SCO1673	-0.78087	7.90E-03	hypothetical protein
	SCO2108	-0.78155	5.87E-03	hypothetical protein
	SCO0593	-0.78345	6.16E-04	hypothetical protein
	SCO4348	-0.78505	8.68E-04	hypothetical protein
	SCO1570	-0.78958	4.59E-03	argininosuccinate lyase
	SCO4048	-0.79543	1.12E-02	hypothetical protein
	SCO4007	-0.79934	1.19E-06	hypothetical protein
	SCO7842	-0.80224	6.36E-06	transposase
	SCO0005	-0.80366	5.19E-06	transposase
	SCO1580	-0.81532	6.94E-03	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
	SCO4937	-0.8192	3.13E-02	hypothetical protein
	SCO0492	-0.81923	2.00E-07	peptide synthetase
	SCO3350	-0.82767	8.03E-04	hypothetical protein
	SCO6094	-0.83408	6.94E-03	transport system integral membrane protein
	SCO1559	-0.83532	1.06E-02	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO1105	-0.84096	1.89E-07	hypothetical protein
	SCO2487	-0.84696	4.52E-02	nitrite reductase large subunit NirB
	SCO4164	-0.84721	2.44E-03	thiosulfate sulfurtransferase
	SCO2449	-0.84764	1.15E-04	hypothetical protein
	SCO6099	-0.84943	3.81E-03	adenylyl-sulfate kinase
	SCO1244	-0.85097	1.24E-03	biotin synthase
	SCO1579	-0.85187	6.01E-04	bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase
	SCO3764	-0.85248	3.10E-08	hypothetical protein
	SCO7700	-0.85546	1.29E-03	cyclase
	SCO7434	-0.85837	2.86E-04	lipoprotein
	SCO4999	-0.86083	1.36E-02	hypothetical protein
	SCO0774	-0.87313	1.89E-07	cytochrome P450
	SCO6100	-0.87723	3.80E-03	phosphoadenosine phosphosulfate reductase
	SCO3928	-0.87859	2.73E-03	thiamine biosynthesis protein ThiC

	SCO5175	-0.88275	2.09E-06	hypothetical protein
	SCO0991	-0.88614	1.65E-03	hypothetical protein
	SCO5249	-0.88905	4.62E-05	nucleotide-binding protein
	SCO0888	-0.89753	6.29E-04	hypothetical protein
	SCO0219	-0.90091	2.63E-04	nitrate reductase subunit delta NarI2
	SCO5640	-0.90549	1.34E-02	hypothetical protein
	SCO7841	-0.94719	2.28E-05	ATP/GTP-binding protein
	SCO1785	-0.96052	8.48E-05	iron-siderophore uptake system ATP-binding protein
	SCO1866	-0.96154	7.36E-04	L-ectoine synthase
	SCO2269	-0.96949	9.86E-03	hypothetical protein
	SCO0631	-0.97713	2.37E-02	hypothetical protein
	SCO0958	-0.9788	1.61E-07	hypothetical protein
	SCO7709	-0.97882	2.65E-06	MarR family transcriptional regulator
	SCO0006	-0.9907	5.51E-06	ATP/GTP-binding protein
	SCO2213	-0.99254	3.91E-04	regulatory protein
	SCO7014	-1.0074	4.66E-07	LacI family transcriptional regulator
	SCO6663	-1.00908	1.49E-06	transketolase
	SCO2272	-1.00975	1.08E-03	binding-protein-dependent transport lipoprotein
	SCO0995	-1.01011	1.23E-03	methyltransferase
	SCO1867	-1.01121	1.90E-04	hydroxylase
	SCO1947	-1.01961	1.17E-04	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	SCO5535	-1.03382	3.84E-04	carboxyl transferase
	SCO6097	-1.03994	1.18E-04	sulfate adenylyltransferase subunit 1
	SCO2780	-1.04514	8.24E-06	hypothetical protein
	SCO2911	-1.05744	3.61E-07	hypothetical protein
	SCO2256	-1.06568	2.11E-11	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase
	SCO6098	-1.06687	6.33E-05	sulfate adenylyltransferase subunit 2
	SCO5772	-1.08675	2.13E-05	hypothetical protein
	SCO2016	-1.0882	8.81E-10	monooxygenase
	SCO5977	-1.09302	4.27E-14	amino acid permease
	SCO2912	-1.09334	6.35E-05	hypothetical protein
	SCO5976	-1.09387	8.40E-07	ornithine carbamoyltransferase
	SCO7398	-1.09592	1.83E-12	iron-hydroxamate transporter permease subunit
	SCO1133	-1.09704	5.15E-09	oxidoreductase%2C molybdopterin binding subunit
	SCO6426	-1.10794	2.07E-02	hypothetical protein
	SCO0587	-1.10904	3.96E-06	hypothetical protein
	SCO5578	-1.11206	1.15E-06	sugar transporter

	SCO7153	-1.12814	1.80E-07	sugar transporter
	SCO1086	-1.12848	4.87E-05	hypothetical protein
	SCO3253	-1.13698	4.03E-02	SpdD protein
	SCO0586	-1.13735	8.88E-07	hypothetical protein
	SCO0994	-1.14354	1.93E-11	hypothetical protein
	SCO0799	-1.15637	2.32E-03	hypothetical protein
	SCO3711	-1.15979	4.43E-07	small membrane protein
	SCO6056	-1.20128	4.44E-09	hypothetical protein
	SCO0218	-1.20791	3.80E-08	nitrate reductase subunit delta NarJ2
	SCO0681	-1.26722	2.62E-06	ferredoxin/ferredoxin-NADP reductase
	SCO4337	-1.32105	6.46E-10	integral membrane efflux protein
	SCO5177	-1.33871	1.17E-09	hypothetical protein
	SCO4347	-1.35506	2.37E-20	hypothetical protein
	SCO0459	-1.44625	4.38E-09	hypothetical protein
	SCO0499	-1.46622	2.71E-07	formyltransferase
	SCO0992	-1.48106	8.82E-18	cysteine synthase
	SCO0073	-1.51153	8.48E-13	hypothetical protein
	SCO1294	-1.53573	2.74E-05	cystathionine gamma-synthase
	SCO5176	-1.60894	1.09E-15	reductase
	SCO2958	-1.72813	2.00E-11	bifunctional uroporphyrinogen-III synthetase/response regulator domain-containing protein
	SCO7400	-1.72889	8.39E-13	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO2383	-1.74162	3.99E-17	hypothetical protein
	SCO2198	-1.81798	1.89E-13	glutamine synthetase
	SCO1293	-1.83038	7.38E-17	hypothetical protein
	SCO2471	-1.83141	7.44E-08	hypothetical protein
	SCO7399	-1.89778	5.56E-16	binding-protein-dependent transport lipoprotein
	SCO2784	-1.95187	3.34E-04	aceytltranferase
	SCO2782	-1.9557	1.88E-11	pyridoxal-dependent decarboxylase
	SCO2785	-2.04246	3.47E-15	hypothetical protein
	SCO0498	-2.18168	4.51E-32	peptide monooxygenase
	SCO2271	-2.24949	1.86E-20	hypothetical protein
	SCO2783	-2.26307	1.90E-25	monooxygenase
	SCO2270	-2.46119	1.92E-29	hypothetical protein
	SCO2211	-3.73809	9.64E-80	hypothetical protein
	SCO7598	-3.86577	3.93E-03	hypothetical protein
	SCO5585	-4.13687	1.90E-59	PII uridylyl-transferase

	SCO5584	-4.36288	7.98E-56	nitrogen regulatory protein P-II
	SCO5583	-5.36105	2.11E-208	ammonium transporter
	SCO2210	-6.04839	2.99E-03	glutamine synthetase

0h-1h

	Locus_tag	Log2 fold-change	FDR	Product
Upregulated	SCO2113	2.929	9.42E-26	bacterioferritin
	SCO3299	2.553	6.80E-39	hypothetical protein
	SCO1905	2.482	1.56E-60	hypothetical protein
	SCO4979	2.407	1.94E-26	phosphoenolpyruvate carboxykinase
	SCO1700	2.362	1.11E-28	hypothetical protein
	SCO2146	2.347	1.08E-29	aminotransferase
	SCO4784	2.267	2.53E-22	hypothetical protein
	SCO3285	2.184	7.64E-51	large glycine/alanine rich protein
	SCO1699	2.146	1.21E-25	transcriptional regulator
	SCO5973	2.113	1.32E-41	phosphatase
	SCO5972	2.084	7.81E-37	3' terminal RNA ribose 2'-O-methyltransferase Hen1
	SCO5191	2.080	1.06E-20	hypothetical protein
	SCO3825	2.068	1.22E-34	ABC-transporter transmembrane protein
	SCO3286	2.036	3.96E-26	hypothetical protein
	SCO3824	2.006	4.43E-32	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO1698	2.003	2.92E-20	hypothetical protein
	SCO6529	1.932	1.23E-22	ATP/GTP binding protein
	SCO0783	1.924	1.40E-29	tetracycline resistance protein
	SCO0795	1.894	4.38E-27	hypothetical protein
	SCO5190	1.867	1.65E-24	DNA-binding protein
	SCOt59	1.857	1.50E-09	tRNA-Gln
	SCO4225	1.822	2.34E-08	hypothetical protein
	SCO2145	1.733	1.55E-13	glycerate kinase
	SCO1174	1.730	5.89E-13	aldehyde dehydrogenase
	SCO5796	1.703	9.45E-11	hypothetical protein
	SCO4783	1.687	2.13E-11	hypothetical protein
	SCO1086	1.665	6.37E-11	hypothetical protein
	SCO1413	1.647	5.01E-21	hypothetical protein
	SCO0922	1.636	3.64E-12	succinate dehydrogenase/fumarate reductase iron-

				sulfur subunit
	SCO6682	1.618	1.04E-06	hypothetical protein
	SCO1963	1.578	6.30E-13	integral membrane export protein
	SCO6530	1.578	1.39E-16	hypothetical protein
	SCO0909	1.564	7.97E-11	hypothetical protein
	SCO7511	1.558	1.87E-09	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
	SCO6512	1.534	2.36E-16	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO1340	1.531	1.42E-11	hypothetical protein
	SCO0924	1.520	8.74E-07	cytochrome B subunit
	SCO7460	1.509	1.22E-05	lipoprotein
	SCO5521	1.479	4.94E-10	hypothetical protein
	SCO6429	1.472	1.05E-08	hypothetical protein
	SCO3287	1.470	3.67E-05	serine/arginine rich protein
	SCO7461	1.461	1.35E-05	hydrolase
	SCO5451	1.457	1.39E-16	ABC transporter
	SCO0106	1.446	1.24E-09	insertion element transposase
	SCO0408	1.437	2.41E-11	methyltransferase
	SCO1575	1.416	5.05E-16	thiamine biosynthesis lipoprotein
	SCO0908	1.405	3.68E-11	hypothetical protein
	SCO6729	1.403	8.74E-07	hypothetical protein
	SCO4683	1.383	4.02E-10	glutamate dehydrogenase
	SCO2027	1.376	2.60E-14	hypothetical protein
	SCO0854	1.373	3.02E-12	hypothetical protein
	SCO2100	1.351	1.02E-05	transcriptional regulator
	SCO6681	1.347	6.03E-09	Ser/Thr protein kinase
	SCO4224	1.339	1.80E-06	hypothetical protein
	SCO4963	1.321	2.80E-09	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO2591	1.300	4.77E-06	hypothetical protein
	SCO7653	1.298	1.80E-05	hypothetical protein
	SCO5861	1.297	1.66E-09	hypothetical protein
	SCO1558	1.290	8.16E-12	ABC transporter permease
	SCO1729	1.266	3.40E-11	hypothetical protein
	SCO4765	1.263	5.99E-12	hypothetical protein
	SCO6447	1.260	8.30E-09	NAD(P)H oxidoreductase
	SCO7612	1.240	5.79E-06	hypothetical protein
	SCO1341	1.216	2.90E-08	lipoprotein
	SCO7731	1.215	6.48E-11	hypothetical protein

	SCO3006	1.208	3.18E-13	acetyltransferase
	SCO4293	1.207	3.03E-09	threonine synthase
	SCO6435	1.191	1.22E-05	hypothetical protein
	SCO3631	1.188	3.53E-07	hypothetical protein
	SCO6295	1.186	5.02E-15	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO5157	1.185	6.78E-06	metal-transport protein
	SCO1580	1.179	1.54E-05	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
	SCO4924	1.179	2.86E-03	hypothetical protein
	SCO1586	1.176	4.66E-08	hypothetical protein
	SCO1585	1.171	3.10E-05	hypothetical protein
	SCO6517	1.169	1.27E-08	uvrA-like protein
	SCO4964	1.168	1.60E-11	integral membrane transport protein
	SCO0607	1.168	3.38E-03	lipoprotein
	SCO1578	1.167	4.73E-05	acetylglutamate kinase
	SCO1576	1.164	1.99E-04	arginine repressor
	SCO6434	1.163	3.27E-07	oxidoreductase
	SCO0187	1.155	7.68E-04	phytoene synthase
	SCO7507	1.149	2.98E-08	dioxygenase
	SCO4264	1.149	2.40E-15	aminoglycoside phosphotransferase
	SCO1988	1.149	3.84E-07	hypothetical protein
	SCO1577	1.147	1.24E-04	acetylornithine aminotransferase
	SCO2379	1.142	2.85E-08	acetyltransferase
	SCO7606	1.141	4.68E-08	amino acid binding protein
	SCO0906	1.140	3.16E-05	hypothetical protein
	SCO2248	1.137	8.12E-08	hypothetical protein
	SCO1175	1.136	1.88E-04	hypothetical protein
	SCO1084	1.134	2.34E-07	thioredoxin
	SCO2257	1.126	1.01E-06	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO2247	1.118	2.40E-08	hypothetical protein
	SCO7613	1.116	6.03E-04	hypothetical protein
	SCO0186	1.113	4.06E-04	phytoene dehydrogenase
	SCO1579	1.112	1.68E-06	bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase
	SCO1986	1.107	1.61E-04	hypothetical protein
	SCO1545	1.106	2.97E-05	acetyltransferase
	SCO1773	1.102	1.22E-04	L-alanine dehydrogenase
	SCO1147	1.099	3.92E-14	ABC transporter transmembrane subunit

	SCO7806	1.096	4.95E-05	DNA-binding protein
	SCO0608	1.093	3.17E-04	regulatory protein
	SCO1562	1.090	3.03E-05	hypothetical protein
	SCO3953	1.081	1.60E-11	RNA 2'-phosphotransferase-like protein
	SCO2117	1.075	1.57E-10	anthranilate synthase
	SCO5147	1.073	3.91E-06	RNA polymerase sigma factor SigE
	SCO5189	1.067	2.59E-04	hypothetical protein
	SCO6433	1.066	1.01E-06	hypothetical protein
	SCO3366	1.058	4.56E-05	exporter
	SCO6431	1.051	1.12E-06	peptide synthase
	SCO4908	1.050	5.68E-06	RNA polymerase sigma factor
	SCO7478	1.044	1.33E-06	phosphotransferase
	SCO5047	1.041	9.84E-04	fructose 1%2C6-bisphosphatase II
	SCO1816	1.041	5.72E-09	hypothetical protein
	SCO1731	1.037	2.06E-08	hypothetical protein
	SCO6464	1.036	1.08E-05	SIR2 family transcriptional regulator
	SCO0907	1.035	7.14E-07	dehydrogenase
	SCO4055	1.027	6.66E-11	alcohol dehydrogenase
	SCO4186	1.023	1.99E-07	hypothetical protein
	SCO7721	1.021	2.15E-10	hypothetical protein
	SCO0409	1.020	1.79E-05	spore-associated protein
	SCO7652	1.019	7.73E-04	acetyltransferase
	SCO3562	1.009	4.62E-13	integral membrane transport protein
	SCO6437	1.005	1.06E-10	hypothetical protein
	SCO7447	1.001	3.93E-05	acetyltranferase
	SCO4278	0.998	1.48E-06	peptidyl-tRNA hydrolase domain-containing protein
	SCO5974	0.998	6.28E-03	integral membrane ion exchanger
	SCO6436	0.996	1.59E-05	tRNA synthetase
	SCO1148	0.988	3.48E-11	ABC transporter
	SCO0955	0.983	2.62E-03	hypothetical protein
	SCO3606	0.983	1.24E-04	regulator
	SCO2755	0.979	1.12E-05	acetyltransferase
	SCO5450	0.972	4.27E-12	ABC transporter
	SCO5676	0.966	5.10E-07	4-aminobutyrate aminotransferase
	SCO5449	0.965	5.17E-08	ABC transporter
	SCO2463	0.965	9.55E-05	ABC transporter
	SCO1405	0.962	5.76E-07	HSP90 family protein

	SCO1624	0.953	1.24E-04	acetyltransferase
	SCO4564	0.948	1.77E-05	NADH dehydrogenase subunit C
	SCO2373	0.947	8.42E-04	tetracenomycin C efflux protein
	SCO6952	0.946	2.83E-05	hypothetical protein
	SCO5044	0.943	1.86E-03	fumarate hydratase class I
	SCO7265	0.939	2.45E-04	hypothetical protein
	SCO5024	0.936	1.44E-04	oxidoreductase
	SCO0685	0.933	5.47E-04	hypothetical protein
	SCOt11	0.921	2.54E-02	tRNA-Met
	SCO2183	0.921	1.90E-03	2-oxoacid dehydrogenase subunit E1
	SCO6617	0.920	5.46E-03	hypothetical protein
	SCO2876	0.916	1.76E-06	acetyltransferase
	SCO0796	0.914	1.70E-06	hypothetical protein
	SCO5473	0.906	4.35E-04	ATP/GTP binding protein
	SCO4226	0.904	3.45E-04	hypothetical protein
	SCO4054	0.901	9.30E-03	hypothetical protein
	SCO3167	0.901	4.53E-04	TetR family transcriptional regulator
	SCO1647	0.891	5.25E-05	hypothetical protein
	SCO7710	0.887	2.40E-06	phosphotransferase
	SCO3602	0.880	3.29E-08	transmembrane transport protein
	SCO2258	0.879	8.61E-04	ABC transporter
	SCO3360	0.877	2.03E-06	hypothetical protein
	SCO7366	0.877	3.87E-03	hypothetical protein
	SCO1563	0.873	3.00E-02	acetyltransferase
	SCO3917	0.872	2.25E-05	hypothetical protein
	SCO6008	0.870	1.44E-02	transcriptional repressor protein
	SCO7651	0.868	1.24E-04	TetR family transcriptional regulator
	SCO1406	0.868	2.66E-04	hypothetical protein
	SCO7205	0.868	6.12E-05	hydrolase
	SCO2496	0.862	8.12E-04	hypothetical protein
	SCO5107	0.860	5.40E-04	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
	SCO0921	0.860	9.10E-05	hypothetical protein
	SCO3097	0.859	7.09E-04	hypothetical protein
	SCO5783	0.859	3.44E-02	hypothetical protein
	SCO0181	0.851	7.52E-06	hypothetical protein
	SCO3607	0.850	5.93E-03	hypothetical protein
	SCO5784	0.849	1.22E-04	two-component sensor

	SCO0381	0.847	4.88E-03	glycosyl transferase
	SCO4572	0.843	2.92E-02	NADH dehydrogenase subunit K
	SCO5148	0.842	7.78E-03	hypothetical protein
	SCO0684	0.841	1.51E-02	hypothetical protein
	SCO0382	0.841	2.27E-03	UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase
	SCO1048	0.837	1.51E-02	hypothetical protein
	SCO3788	0.832	1.51E-02	hypothetical protein
	SCO1987	0.830	9.04E-03	hypothetical protein
	SCO0177	0.827	1.77E-04	hypothetical protein
	SCO2999	0.826	4.88E-03	hypothetical protein
	SCO7036	0.825	1.26E-02	argininosuccinate synthase
	SCO3111	0.823	1.69E-03	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO1559	0.819	1.79E-02	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO5999	0.818	3.25E-03	aconitate hydratase
	SCO2917	0.818	6.03E-03	nicotinate phosphoribosyltransferase
	SCO2372	0.814	2.04E-02	small hydrophobic protein
	SCO6432	0.813	1.01E-04	peptide synthase
	SCO5326	0.812	2.79E-03	hypothetical protein
	SCO3711	0.807	9.43E-04	small membrane protein
	SCO6446	0.807	1.51E-05	hypothetical protein
	SCO6228	0.805	1.40E-03	hypothetical protein
	SCO1404	0.805	9.53E-04	hypothetical protein
	SCO4311	0.804	5.80E-05	hypothetical protein
	SCO3977	0.803	1.00E-02	protease
	SCO4011	0.802	2.92E-02	hypothetical protein
	SCO5679	0.802	4.01E-03	aldehyde dehydrogenase
	SCO3710	0.801	3.54E-03	large integral membrane protein
	SCO4440	0.795	5.89E-03	hypothetical protein
	SCO1989	0.794	6.76E-03	aminopeptidase
	SCO1570	0.793	5.50E-03	argininosuccinate lyase
	SCO1765	0.792	3.22E-03	hypothetical protein
	SCO0174	0.792	2.26E-04	DNA-binding protein
	SCO1904	0.788	1.36E-02	transcriptional regulator
	SCO6009	0.785	2.40E-02	solute-binding protein
	SCO1403	0.785	1.61E-02	hypothetical protein
	SCO4903	0.778	3.87E-03	hypothetical protein
	SCO5976	0.777	1.44E-03	ornithine carbamoyltransferase

	SCO3105	0.775	2.13E-03	hypothetical protein
	SCO4222	0.774	4.05E-04	hypothetical protein
	SCO0166	0.768	8.12E-04	regulator
	SCO4980	0.767	3.33E-04	hypothetical protein
	SCO1902	0.767	4.79E-02	hypothetical protein
	SCO1085	0.764	1.51E-03	acyltransferase
	SCO1569	0.764	1.91E-02	oxidoreductase
	SCO4565	0.759	2.25E-05	NADH dehydrogenase subunit D
	SCO6683	0.759	2.84E-03	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO2770	0.758	5.56E-04	agmatinase
	SCO2464	0.755	2.38E-06	ABC transporter
	SCO1640	0.755	3.00E-02	hypothetical protein
	SCO3656	0.750	1.71E-05	hypothetical protein
	SCO4676	0.746	1.66E-03	hypothetical protein
	SCO5660	0.743	5.29E-04	peptidase
	SCO5025	0.740	8.56E-04	transcriptional regulator
	SCO1334	0.734	3.79E-02	hypothetical protein
	SCO4006	0.733	2.38E-06	long-chain-fatty-acid--CoA ligase
	SCO3277	0.731	1.29E-02	phosphotransferase
	SCO1083	0.724	1.08E-02	flavin-dependent reductase
	SCO1795	0.723	2.29E-03	hypothetical protein
	SCO0954	0.714	2.89E-05	acetyltransferase
	SCO6304	0.712	1.21E-03	oxidoreductase
	SCO4409	0.711	6.22E-03	RNA polymerase sigma factor
	SCO6821	0.709	6.80E-04	hypothetical protein
	SCO3940	0.702	3.33E-02	transmembrane protein
	SCO1322	0.698	1.49E-03	hypothetical protein
	SCO5332	0.696	3.66E-02	hypothetical protein
	SCO5863	0.694	2.83E-02	two-component sensor (kinase)
	SCO4563	0.694	2.15E-02	NADH dehydrogenase subunit B
	SCO4954	0.693	5.59E-03	hypothetical protein
	SCO5166	0.690	2.37E-02	helicase
	SCO3385	0.687	2.08E-03	L-allo-threonine aldolase
	SCO1656	0.685	8.68E-03	hydrolase
	SCO6805	0.684	4.14E-04	integral membrane efflux protein
	SCO5785	0.682	1.17E-02	two-component regulator
	SCO2404	0.681	3.93E-04	sugar-binding receptor

	SCO4092	0.677	5.98E-03	ATP-dependent helicase
	SCO3007	0.674	1.58E-04	hypothetical protein
	SCO4098	0.673	1.76E-03	acetyltransferase
	SCO1544	0.673	2.43E-02	hypothetical protein
	SCO5977	0.673	9.39E-06	amino acid permease
	SCO3284	0.669	1.87E-05	hypothetical protein
	SCO0208	0.668	4.55E-05	pyruvate phosphate dikinase
	SCO2862	0.664	1.69E-02	hypothetical protein
	SCO3165	0.662	9.09E-03	hypothetical protein
	SCO1307	0.662	1.21E-02	hypothetical protein
	SCO3601	0.661	1.95E-03	hypothetical protein
	SCO2625	0.661	4.62E-04	hypothetical protein
	SCO1927	0.661	2.57E-03	AAC(3) family N-acetyltransferase
	SCO4976	0.659	2.06E-04	hypothetical protein
	SCO2318	0.658	3.79E-03	glycosyl transferase
	SCO6011	0.654	4.89E-02	ABC transporter
	SCO1165	0.653	2.53E-02	hypothetical protein
	SCO3321	0.653	3.16E-02	redoxin
	SCO2527	0.653	1.38E-03	hypothetical protein
	SCO0107	0.652	4.02E-02	aminoglycoside nucleotidyltransferase
	SCO5436	0.650	1.34E-02	sodium:dicarboxylate symporter
	SCO1596	0.648	9.14E-03	two-component sensor
	SCO2343	0.647	9.14E-03	acetyltransferase
	SCO0597	0.644	1.43E-02	hypothetical protein
	SCO2524	0.642	2.61E-02	hypothetical protein
	SCO3056	0.641	2.50E-02	hypothetical protein
	SCO2309	0.640	4.54E-04	transmembrane transport protein
	SCO7197	0.640	5.40E-04	amino acid ABC transporter permease
	SCO0215	0.635	5.09E-04	hypothetical protein
	SCO0593	0.632	7.95E-03	hypothetical protein
	SCO5004	0.624	1.35E-02	hypothetical protein
	SCO6430	0.623	4.15E-02	hypothetical protein
	SCO1726	0.623	9.99E-04	ATPase
	SCO5222	0.621	1.56E-03	lyase
	SCO7722	0.619	1.35E-02	hypothetical protein
	SCO0784	0.619	4.89E-02	hypothetical protein
	SCO5949	0.619	1.78E-02	hypothetical protein

	SCO3110	0.618	3.99E-02	ABC transporter
	SCO2236	0.618	3.70E-02	hypothetical protein
	SCO7824	0.618	9.17E-03	TetR family transcriptional regulator
	SCO4609	0.615	3.61E-02	heat shock protein HtpX
	SCO4566	0.608	1.61E-02	NADH dehydrogenase subunit E
	SCO5009	0.606	3.45E-03	secretory protein
	SCO5851	0.604	1.22E-02	hypothetical protein
	SCO0180	0.604	2.74E-02	hypothetical protein
	SCO1144	0.601	1.69E-03	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO5817	0.600	2.43E-02	DNA hydrolase
	SCO3563	0.597	3.44E-02	acetyl-CoA synthetase
	SCO6005	0.595	7.06E-03	lipoprotein
	SCO0170	0.595	3.47E-02	hypothetical protein
	SCO5811	0.593	4.22E-03	transcriptional regulator
	SCO6513	0.591	1.65E-02	hypothetical protein
	SCO2465	0.589	3.62E-02	RNA polymerase principal sigma factor
	SCO5333	0.586	3.58E-02	hypothetical protein
	SCO1817	0.584	1.04E-02	hypothetical protein
	SCO4309	0.584	4.09E-02	hypothetical protein
	SCO4279	0.583	4.00E-02	acetyltransferase
	SCO3323	0.579	2.35E-02	RNA polymerase sigma factor
	SCO2311	0.577	4.01E-03	hypothetical protein
	SCO6045	0.575	9.54E-03	hypothetical protein
	SCO4827	0.574	4.80E-02	malate dehydrogenase
	SCO4020	0.571	7.51E-03	two component system response regulator
	SCO3289	0.564	1.12E-02	large membrane protein
	SCO4075	0.563	8.65E-03	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO7005	0.562	6.28E-03	oxidoreductase
	SCO7367	0.559	4.22E-03	membrane efflux protein
	SCO6149	0.551	2.00E-02	ribosome-associated GTPase
	SCO5629	0.538	6.65E-04	ATP /GTP-binding protein
	SCO4630	0.534	3.47E-02	hypothetical protein
	SCO4188	0.530	6.07E-03	GntR family transcriptional regulator
	SCO2861	0.527	2.79E-02	hypothetical protein
	SCO3288	0.527	4.46E-02	hypothetical protein
	SCO3826	0.518	8.81E-03	ion channel membrane protein
	SCO2018	0.514	5.02E-02	aminopeptidase

	SCP2.02	0.508	1.36E-02	putative is1648 transposase
	SCO5810	0.504	2.30E-02	transmembrane efflux protein
	SCO4157	0.501	5.50E-03	protease
	SCO4290	0.501	1.15E-02	trehalose-phosphate synthase
	SCO1727	0.500	2.80E-02	hypothetical protein
Downregulated	SCO6564	-0.509	3.30E-02	3-oxoacyl-ACP synthase III
	SCO4740	-0.510	2.42E-02	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase
	SCO5516	-0.511	1.24E-02	integral membrane efflux protein
	SCO1620	-0.516	1.29E-02	glycine/betaine ABC transporter permease
	SCO3311	-0.536	2.86E-02	delta-aminolevulinic acid dehydratase
	SCO1683	-0.538	1.07E-03	amino acid permease
	SCO4347	-0.567	7.16E-04	hypothetical protein
	SCO0104	-0.582	3.87E-02	hydrolase
	SCO1105	-0.594	5.64E-04	hypothetical protein
	SCO1374	-0.608	6.03E-04	hypothetical protein
	SCO2256	-0.616	4.06E-04	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase
	SCO0496	-0.624	1.61E-02	iron-siderophore permease transmembrane protein
	SCO1487	-0.628	6.16E-03	aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit
	SCO5281	-0.635	4.47E-02	alpha-ketoglutarate decarboxylase
	SCO2995	-0.641	1.12E-03	ABC transporter
	SCO6453	-0.651	3.72E-02	transport permease
	SCO1946	-0.651	3.61E-02	phosphoglycerate kinase
	SCO1621	-0.662	1.10E-02	glycine/betaine transport ATP-binding protein
	SCO4739	-0.672	2.00E-02	lipoprotein
	SCO4950	-0.677	3.29E-02	nitrate reductase subunit gamma NarI3
	SCO1441	-0.679	1.76E-02	bifunctional 3%2C4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II protein
	SCO2267	-0.691	2.27E-03	heme oxygenase
	SCO1776	-0.707	1.44E-02	CTP synthetase
	SCO2389	-0.710	3.79E-02	acyl carrier protein
	SCO0958	-0.710	3.62E-04	hypothetical protein
	SCO1246	-0.718	2.51E-03	dithiobiotin synthetase
	SCO2241	-0.722	6.03E-03	glutamine synthetase
	SCO1481	-0.729	1.45E-02	orotidine 5'-phosphate decarboxylase
	SCO5515	-0.749	2.50E-02	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
	SCO4948	-0.771	5.89E-03	nitrate reductase subunit beta NarH3
	SCO4949	-0.775	3.70E-02	nitrate reductase subunit delta NarJ3

	SCO5650	-0.783	2.68E-02	hypothetical protein
	SCO6451	-0.783	2.33E-03	substrate binding protein
	SCO1916	-0.784	1.17E-02	2%2C3%2C4%2C5-tetrahydropyridine-2%2C6-dicarboxylate N-succinyltransferase
	SCO6770	-0.792	1.41E-02	DNA-binding protein
	SCO2388	-0.797	3.93E-02	3-oxoacyl-ACP synthase III
	SCO3127	-0.812	1.60E-04	phosphoenolpyruvate carboxylase
	SCO2276	-0.812	1.53E-04	hypothetical protein
	SCO2195	-0.824	7.15E-03	hypothetical protein
	SCO2390	-0.836	9.11E-03	3-oxoacyl-ACP synthase
	SCO2528	-0.850	2.66E-03	2-isopropylmalate synthase
	SCO1482	-0.873	6.55E-05	dihydroorotate dehydrogenase 2
	SCO2630	-0.881	7.64E-04	biotin synthase
	SCO0488	-0.892	9.00E-05	hydrolase
	SCO4048	-0.905	3.02E-03	hypothetical protein
	SCO5536	-0.929	6.83E-03	hypothetical protein
	SCO2025	-0.934	7.51E-04	glutamate synthase
	SCO0073	-0.940	1.22E-05	hypothetical protein
	SCO4501	-0.956	3.13E-04	3-ketoacyl-ACP reductase
	SCO5535	-0.959	1.48E-03	carboxyl transferase
	SCO5470	-0.974	9.56E-05	serine hydroxymethyltransferase
	SCO4047	-0.976	6.59E-05	hypothetical protein
	SCO4947	-0.979	2.69E-11	nitrate reductase subunit alpha NarG3
	SCO1245	-1.011	1.56E-05	adenosylmethionine--8-amino-7-oxononanoate aminotransferase BioA
	SCO2383	-1.012	7.17E-06	hypothetical protein
	SCO1814	-1.023	2.71E-03	enoyl-ACP reductase
	SCO4838	-1.044	1.14E-06	hypothetical protein
	SCO2026	-1.059	2.25E-05	glutamate synthase
	SCO6426	-1.069	9.42E-03	hypothetical protein
	SCO1235	-1.108	1.69E-03	urease subunit beta
	SCO1244	-1.121	5.50E-06	biotin synthase
	SCO0888	-1.157	2.57E-06	hypothetical protein
	SCO0631	-1.160	1.46E-04	hypothetical protein
	SCO2633	-1.166	3.68E-05	superoxide dismutase
	SCO0497	-1.191	1.71E-04	iron-siderophore permease transmembrane protein
	SCO2268	-1.247	3.56E-08	hypothetical protein

	SCO2789	-1.247	1.02E-09	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase
	SCO2272	-1.250	1.71E-05	binding-protein-dependent transport lipoprotein
	SCO4159	-1.265	1.94E-06	transcriptional regulator
	SCO1294	-1.294	6.43E-04	cystathionine gamma-synthase
	SCO6158	-1.316	2.33E-14	hypothetical protein
	SCO5830	-1.378	8.42E-10	hypothetical protein
	SCO1947	-1.410	1.05E-08	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	SCO2275	-1.411	8.86E-16	lipoprotein
	SCO0491	-1.524	8.54E-14	ABC transporter
	SCO0495	-1.569	6.97E-08	iron-siderophore ABC-transporter ATP-binding protein
	SCO2781	-1.584	4.86E-14	hypothetical protein
	SCO2958	-1.587	6.16E-10	bifunctional uroporphyrinogen-III synthetase/response regulator domain-containing protein
	SCO0490	-1.615	9.30E-18	esterase
	SCO2471	-1.638	1.70E-06	hypothetical protein
	SCO1293	-1.725	1.16E-15	hypothetical protein
	SCO1787	-1.768	5.93E-14	iron-siderophore uptake system transmembrane protein
	SCO1623	-1.770	1.00E-10	hypothetical protein
	SCO2785	-1.964	2.43E-14	hypothetical protein
	SCO0492	-1.971	1.09E-42	peptide synthetase
	SCO2784	-1.988	5.66E-13	aceytltranferase
	SCO0799	-1.994	1.05E-13	hypothetical protein
	SCO7398	-2.013	1.58E-40	iron-hydroxamate transporter permease subunit
	SCO2782	-2.098	2.39E-13	pyridoxal-dependent decarboxylase
	SCO0681	-2.385	3.42E-22	ferredoxin/ferredoxin-NADP reductase
	SCO2783	-2.400	1.71E-29	monooxygenase
	SCO1786	-2.507	5.41E-30	iron-siderophore uptake system transmembrane protein
	SCO0493	-2.512	1.85E-23	ABC-transporter transmembrane protein
	SCO0489	-2.533	1.33E-14	hypothetical protein
	SCO2271	-2.632	2.13E-28	hypothetical protein
	SCO2198	-2.701	7.94E-30	glutamine synthetase
	SCO1785	-2.748	8.66E-37	iron-siderophore uptake system ATP-binding protein
	SCO2270	-2.754	2.92E-37	hypothetical protein
	SCO2211	-3.363	2.56E-68	hypothetical protein
	SCO0494	-3.376	4.33E-39	iron-siderophore binding lipoprotein
	SCO0499	-3.493	1.50E-39	formyltransferase
	SCO0459	-3.495	1.37E-50	hypothetical protein

	SCO2780	-3.574	1.45E-64	hypothetical protein
	SCO5584	-3.713	5.70E-51	nitrogen regulatory protein P-II
	SCO7400	-3.798	1.86E-57	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO5585	-3.803	3.70E-51	PII uridylyl-transferase
	SCO0498	-3.884	5.48E-98	peptide monooxygenase
	SCO7399	-4.136	6.64E-71	binding-protein-dependent transport lipoprotein
	SCO5583	-4.931	1.17E-18	ammonium transporter
	SCO2210	-6.000	2.99E-03	glutamine synthetase

1h-2h

	Locus_tag	log2 Fold-change	FDR	Product
upregulated	SCO4425	2.733	2.14E-18	sigma-like protein
	SCO0494	2.675	2.43E-24	iron-siderophore binding lipoprotein
	SCO2780	2.529	1.06E-31	hypothetical protein
	SCO4225	2.447	3.79E-15	hypothetical protein
	SCO7460	2.362	2.97E-14	lipoprotein
	SCO7399	2.238	4.38E-20	binding-protein-dependent transport lipoprotein
	SCO3230	2.207	3.97E-02	CDA peptide synthetase I
	SCO1773	2.148	1.09E-17	L-alanine dehydrogenase
	SCO7613	2.100	8.03E-14	hypothetical protein
	SCO0493	2.089	4.92E-16	ABC-transporter transmembrane protein
	SCO7400	2.070	2.10E-16	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO0459	2.049	7.53E-17	hypothetical protein
	SCO0499	2.027	4.76E-13	formyltransferase
	SCO7461	1.987	5.09E-11	hydrolase
	SCO1786	1.892	1.01E-16	iron-siderophore uptake system transmembrane protein
	SCO3900	1.873	9.72E-09	hypothetical protein
	SCO0495	1.797	2.63E-10	iron-siderophore ABC-transporter ATP-binding protein
	SCO1785	1.787	3.79E-15	iron-siderophore uptake system ATP-binding protein
	SCO4224	1.784	1.42E-11	hypothetical protein
	SCO6682	1.779	1.42E-08	hypothetical protein
	SCO1440	1.745	1.98E-07	6%2C7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase

	SCO0607	1.711	9.83E-07	lipoprotein
	SCO0498	1.702	4.54E-18	peptide monooxygenase
	SCO1787	1.675	1.65E-12	iron-siderophore uptake system transmembrane protein
	SCO0736	1.667	7.53E-06	hypothetical protein
	SCO1550	1.666	1.42E-04	small membrane protein
	SCO1623	1.582	1.43E-08	hypothetical protein
	SCO7612	1.544	4.65E-10	hypothetical protein
	SCOt40	1.473	2.33E-03	tRNA-Gly
	SCO4011	1.470	1.37E-07	hypothetical protein
	SCO4635	1.454	5.56E-04	50S ribosomal protein L33
	SCO4924	1.397	7.29E-05	hypothetical protein
	SCO4710	1.386	5.53E-04	50S ribosomal protein L29
	SCO3356	1.358	4.23E-05	ECF sigma factor
	SCO6729	1.354	1.50E-06	hypothetical protein
	SCO5830	1.351	2.49E-09	hypothetical protein
	SCO3899	1.324	2.91E-07	hypothetical protein
	SCO2275	1.319	1.61E-13	lipoprotein
	SCO5841	1.289	4.28E-05	phosphocarrier protein HPr
	SCO3862	1.278	2.20E-03	hypothetical protein
	SCO3924	1.275	1.59E-04	hypothetical protein
	SCO1638	1.256	1.63E-03	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
	SCO2648	1.245	2.93E-04	hypothetical protein
	SCO2947	1.244	2.67E-03	hypothetical protein
	SCO5436	1.228	6.16E-09	sodium:dicarboxylate symporter
	SCO0497	1.212	1.14E-04	iron-siderophore permease transmembrane protein
	SCOr09	1.209	2.66E-03	16S ribosomal RNA
	SCO2066	1.189	3.43E-04	hypothetical protein
	SCO3870	1.181	1.95E-03	hypothetical protein
	SCO4713	1.178	3.04E-03	50S ribosomal protein L24
	SCO4847	1.153	5.63E-05	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
	SCO0492	1.152	2.16E-14	peptide synthetase
	SCO4720	1.146	2.95E-03	50S ribosomal protein L30
	SCO6509	1.140	2.67E-03	hydrophobic protein
	SCO0681	1.118	5.57E-05	ferredoxin/ferredoxin-NADP reductase
	SCO4725	1.117	2.36E-03	translation initiation factor IF-1
	SCO2633	1.111	9.58E-05	superoxide dismutase

	SCO1916	1.106	4.32E-05	2%2C3%2C4%2C5-tetrahydropyridine-2%2C6-dicarboxylate N-succinyltransferase
	SCO4652	1.102	4.61E-03	50S ribosomal protein L10
	SCO1319	1.096	1.26E-03	hypothetical protein
	SCO0609	1.093	7.25E-04	hypothetical protein
	SCOt36	1.091	1.96E-02	tRNA-Arg
	SCO4716	1.091	2.67E-03	30S ribosomal protein S8
	SCO5875	1.084	2.01E-04	potassium uptake protein
	SCO4137	1.081	2.03E-03	hypothetical protein
	SCO1490	1.080	6.58E-03	transcription antitermination protein NusB
	SCO2627	1.077	2.67E-03	ribose-5-phosphate isomerase B
	SCO6722	1.067	5.89E-04	regulator
	SCO4091	1.067	3.29E-03	DNA-binding protein
	SCO5145	1.064	1.79E-02	hypothetical protein
	SCO1254	1.061	4.66E-03	adenylosuccinate lyase
	SCO6452	1.055	6.87E-04	transport permease
	SCO1944	1.054	7.28E-03	preprotein translocase subunit SecG
	SCO2105	1.046	1.39E-02	transcriptional regulator
	SCO3194	1.044	1.77E-04	lipoprotein
	SCO3909	1.044	1.03E-02	50S ribosomal protein L9
	SCO2789	1.040	8.34E-07	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase
	SCO4506	1.039	1.87E-04	hypothetical protein
	SCO6158	1.038	1.26E-08	hypothetical protein
	SCO0608	1.036	6.53E-04	regulatory protein
	SCO3546	1.029	1.84E-03	hypothetical protein
	SCO4077	1.026	2.40E-02	phosphoribosylformylglycinamidine synthase subunit PurS
	SCO1700	1.023	1.77E-05	hypothetical protein
	SCO0703	1.009	4.61E-03	regulator
	SCO5464	1.005	2.80E-03	hypothetical protein
	SCO5797	1.004	1.05E-03	hypothetical protein
	SCO2303	1.001	5.97E-03	hypothetical protein
	SCO3575	0.997	2.67E-03	hypothetical protein
	SCO6225	0.995	1.47E-04	hypothetical protein
	SCO1514	0.984	5.60E-03	adenine phosphoribosyltransferase
	SCO3822	0.980	9.99E-03	hypothetical protein
	SCOs01	0.978	2.48E-02	ribonuclease P RNA

	SCO0491	0.974	1.33E-05	ABC transporter
	SCO4813	0.973	4.64E-03	phosphoribosylglycinamide formyltransferase
	SCO4492	0.971	1.19E-03	octaprenyl carboxylase
	SCO3327	0.971	1.74E-02	hypothetical protein
	SCOr13, SCOr14, SCOr15	0.971	5.03E-03	16S ribosomal RNA, 23S ribosomal RNA, 5S ribosomal RNA
	SCO2888	0.966	1.35E-02	hypothetical protein
	SCO4992	0.963	1.63E-02	hypothetical protein
	SCO4561	0.962	7.20E-03	hypothetical protein
	SCO1699	0.962	2.88E-05	transcriptional regulator
	SCO1391	0.954	3.18E-03	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase
	SCO4037	0.952	1.18E-02	small membrane protein
	SCO4721	0.949	6.58E-03	50S ribosomal protein L15
	SCOr10, SCOr11, SCOr12	0.948	9.10E-03	5S ribosomal RNA, 23S ribosomal RNA, 16S ribosomal RNA
	SCO5742	0.944	1.01E-02	hypothetical protein
	SCO6224	0.944	1.22E-03	hypothetical protein
	SCO1602	0.941	2.25E-03	hypothetical protein
	SCO1790	0.940	7.18E-03	hypothetical protein
	SCOr4, SCOr5, SCOr6	0.935	7.96E-03	5S ribosomal RNA, 23S ribosomal RNA, 16S ribosomal RNA
	SCO3906	0.934	1.51E-02	30S ribosomal protein S6
	SCO2019	0.933	4.12E-03	chorismate mutase
	SCO2899	0.929	1.70E-02	GroES family molecular chaperone
	SCO3396	0.928	2.58E-05	hypothetical protein
	SCO4885	0.927	5.54E-04	lipoprotein
	SCO3881	0.924	1.55E-02	ribonuclease P component
	SCO1548	0.917	9.99E-03	hypothetical protein
	SCO7398	0.917	7.88E-08	iron-hydroxamate transporter permease subunit
	SCO3397	0.915	1.34E-04	integral membrane lysyl-tRNA synthetase
	SCOr16, SCOr17, SCOr18	0.915	7.51E-03	16S ribosomal RNA, 23S ribosomal RNA, 5S ribosomal RNA
	SCOt31	0.912	2.55E-02	tRNA-Leu

	SCO2041	0.911	1.03E-02	hypothetical protein
	SCO1375	0.910	1.21E-02	hypothetical protein
	SCO7657	0.909	4.66E-03	hypothetical protein
	SCO4719	0.906	1.57E-02	30S ribosomal protein S5
	SCO5151	0.904	6.08E-03	hypothetical protein
	SCO2370	0.904	3.12E-02	hypothetical protein
	SCO3877	0.902	1.57E-02	6-phosphogluconate dehydrogenase
	SCO1600	0.902	2.96E-02	translation initiation factor IF-3
	SCO3092	0.900	7.21E-03	oxidoreductase
	SCOr1, SCOr2, SCOr3	0.898	7.55E-03	5S ribosomal RNA, 23S ribosomal RNA, 16S ribosomal RNA
	SCO1495	0.897	4.52E-02	shikimate kinase
	SCO3897	0.896	9.79E-03	hypothetical protein
	SCO3290	0.894	9.49E-06	hypothetical protein
	SCO2781	0.894	1.77E-04	hypothetical protein
	SCOr08	0.894	1.18E-02	23S ribosomal RNA
	SCO2788	0.890	2.84E-03	hypothetical protein
	SCO4715	0.890	1.23E-02	30S ribosomal protein S14
	SCO5230	0.888	3.97E-02	hypothetical protein
	SCO4686	0.887	1.91E-02	hypothetical protein
	SCO0695	0.886	4.45E-03	hypothetical protein
	SCO7322	0.885	3.09E-02	anti-sigma factor
	SCO1775	0.883	1.35E-02	hypothetical protein
	SCO1442	0.883	2.86E-03	hypothetical protein
	SCO2198	0.883	2.12E-03	glutamine synthetase
	SCO6997	0.881	3.12E-02	hypothetical protein
	SCO1601	0.881	1.83E-02	hypothetical protein
	SCO5720	0.881	6.50E-03	hypothetical protein
	SCO0999	0.880	1.18E-02	superoxide dismutase
	SCO6770	0.877	3.29E-03	DNA-binding protein
	SCO5492	0.875	7.74E-03	short chain dehydrogenase
	SCO3880	0.875	1.59E-02	50S ribosomal protein L34
	SCO2034	0.870	2.17E-02	prolipoprotein diacylglyceryl transferase
	SCO2089	0.869	3.04E-03	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2%2C6-diaminopimelate ligase
	SCO6990	0.864	5.07E-04	membrane transport protein

	SCO0490	0.863	5.62E-05	esterase
	SCO4033	0.862	2.91E-02	hypothetical protein
	SCO1114	0.862	1.13E-02	uracil-DNA glycosylase
	SCO6989	0.861	7.62E-04	hypothetical protein
	SCO2546	0.860	4.77E-04	adenosine deaminase
	SCO1492	0.859	1.58E-02	peptidase
	SCO3289	0.858	4.97E-06	large membrane protein
	SCO1793	0.857	7.09E-03	hypothetical protein
	SCO2457	0.851	2.83E-03	lipoprotein
	SCO4653	0.851	2.18E-02	50S ribosomal protein L7/L12
	SCO3974	0.850	3.30E-03	hypothetical protein
	SCO1400	0.848	4.39E-02	hypothetical protein
	SCO3887	0.847	1.89E-02	partitioning or sporulation protein
	SCO5568	0.845	8.52E-03	phosphopantetheine adenylyltransferase
	SCO5481	0.844	3.65E-04	hypothetical protein
	SCO2593	0.844	1.54E-02	hypothetical protein
	SCO1395	0.841	1.08E-02	mutT-like protein
	SCO3898	0.840	3.74E-05	hypothetical protein
	SCO0799	0.838	1.32E-02	hypothetical protein
	SCO3124	0.835	1.74E-02	50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc
	SCO5724	0.833	3.41E-02	hypothetical protein
	SCO5798	0.830	7.51E-03	hypothetical protein
	SCO2129	0.829	1.83E-02	hypothetical protein
	SCO6482	0.829	2.92E-02	hypothetical protein
	SCO3579	0.824	4.84E-02	regulatory protein
	SCO2025	0.824	3.52E-03	glutamate synthase
	SCO5504	0.823	6.50E-03	hypothetical protein
	SCO2949	0.823	4.18E-03	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase
	SCO4923	0.820	1.83E-02	hypothetical protein
	SCO6139	0.819	6.77E-03	sensor kinase
	SCO3357	0.815	3.81E-03	hypothetical protein
	SCO3097	0.815	1.24E-03	hypothetical protein
	SCO0536	0.814	1.57E-02	hypothetical protein
	SCO5588	0.812	6.02E-03	lipoprotein
	SCO2950	0.810	2.13E-02	DNA-binding protein HU (hs1)
	SCO1470	0.809	2.17E-02	hypothetical protein

	SCO1791	0.809	9.34E-03	hypothetical protein
	SCO5833	0.808	1.09E-02	hypothetical protein
	SCO5570	0.808	4.32E-02	hypothetical protein
	SCO4371	0.806	4.16E-03	hypothetical protein
	SCO0462	0.802	1.18E-02	oxidoreductase
	SCO4726	0.801	3.12E-02	50S ribosomal protein L36
	SCO4848	0.800	5.69E-03	hypothetical protein
	SCO1691	0.799	1.19E-02	TetR family transcriptional regulator
	SCO3629	0.797	3.63E-03	adenylosuccinate synthetase
	SCO7233	0.797	3.34E-03	hypothetical protein
	SCO5413	0.797	2.17E-02	MarR-transcriptional regulator
	SCO3677	0.796	2.41E-02	purine phosphoribosyltransferase
	SCO2154	0.796	3.10E-02	hypothetical protein
	SCO2456	0.795	3.88E-03	hypothetical protein
	SCO6589	0.792	3.27E-02	elongation factor G
	SCO5115	0.792	1.19E-02	ABC transporter intracellular ATPase subunit BldKD
	SCO1401	0.791	2.94E-02	hypothetical protein
	SCO3811	0.789	1.34E-04	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
	SCO1755	0.787	6.44E-03	hypothetical protein
	SCO4509	0.786	2.34E-02	hypothetical protein
	SCO4636	0.786	3.10E-02	hypothetical protein
	SCO2268	0.783	2.32E-03	hypothetical protein
	SCO6757	0.783	3.61E-02	ABC transporter membrane protein
	SCO5541	0.783	4.50E-02	ATP-GTP binding protein
	SCO4637	0.780	1.06E-02	hypothetical protein
	SCO3613	0.779	2.84E-02	RNA polymerase sigma factor
	SCO2458	0.778	1.48E-02	hypothetical protein
	SCO1235	0.778	4.65E-02	urease subunit beta
	SCO1441	0.775	2.89E-03	bifunctional 3%2C4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II protein
	SCO4161	0.775	2.17E-02	molybdopterin converting factor
	SCO1464	0.775	2.53E-02	ribulose-phosphate 3-epimerase
	SCO3676	0.775	1.77E-02	hypothetical protein
	SCO1945	0.775	3.51E-02	triosephosphate isomerase
	SCO3619	0.774	4.45E-02	hypothetical protein
	SCO6031	0.773	3.43E-02	uroporphyrinogen decarboxylase

	SCO2088	0.772	1.03E-02	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2%2C6-diaminopimelate- D-alanyl-alanyl ligase
	SCO1320	0.768	3.86E-03	hypothetical protein
	SCO4718	0.767	3.13E-02	50S ribosomal protein L18
	SCO1390	0.763	2.12E-02	PTS system sugar phosphotransferase component IIA
	SCO3288	0.762	2.77E-04	hypothetical protein
	SCO3180	0.762	4.94E-02	molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaC
	SCO5459	0.760	5.03E-03	enoyl-CoA hydratase
	SCO1806	0.759	1.42E-02	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO5112	0.757	1.03E-02	ABC transporter integral membrane protein BldKA
	SCO5491	0.751	3.13E-02	hypothetical protein
	SCO0627	0.751	4.49E-02	ATP-utilizing protein
	SCO5856	0.750	7.20E-03	hypothetical protein
	SCO2067	0.750	5.55E-03	hypothetical protein
	SCO5470	0.749	4.75E-03	serine hydroxymethyltransferase
	SCO5515	0.748	1.60E-02	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
	SCO4424	0.746	1.90E-03	hypothetical protein
	SCO5537	0.745	3.49E-02	ATP/GTP binding protein
	SCO7284	0.743	4.01E-02	ribonuclease H
	SCO6774	0.743	1.04E-02	hypothetical protein
	SCO5313	0.743	7.32E-03	hypothetical protein
	SCO1566	0.740	3.00E-02	acyltransferase
	SCO1710	0.738	9.27E-04	integral membrane transport protein
	SCO3678	0.737	2.13E-02	deoxycytidine triphosphate deaminase
	SCO4087	0.736	3.33E-02	phosphoribosylaminoimidazole synthetase
	SCO2243	0.733	4.05E-02	TetR family transcriptional regulator
	SCO2628	0.731	2.36E-02	amino acid permease
	SCO3761	0.727	3.27E-02	hypothetical protein
	SCO5664	0.721	2.81E-02	hypothetical protein
	SCO2069	0.720	1.83E-02	hypothetical protein
	SCO3342	0.718	6.60E-03	glycine-rich hypothetical protein
	SCO5876	0.717	1.79E-02	potassium uptake protein
	SCO3572	0.716	3.18E-02	hydrolase
	SCO1875	0.712	5.61E-03	penicillin binding protein
	SCO3911	0.711	3.06E-03	replicative DNA helicase
	SCO6431	0.710	2.59E-03	peptide synthase

	SCO6763	0.709	4.20E-02	polyprenyl synthatase
	SCO5393	0.709	3.74E-02	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO0735	0.709	8.07E-03	oxidoreductase
	SCO0260	0.707	4.12E-02	hypothetical protein
	SCO4172	0.705	2.40E-03	hypothetical protein
	SCO3127	0.704	1.50E-03	phosphoenolpyruvate carboxylase
	SCO5679	0.703	1.12E-02	aldehyde dehydrogenase
	SCO4439	0.702	2.53E-02	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
	SCO4002	0.702	3.72E-03	hypothetical protein
	SCO5114	0.701	1.18E-02	ABC transporter integral membrane protein BldKC
	SCO6715	0.698	3.97E-02	transcriptional regulator
	SCO6430	0.697	8.98E-03	hypothetical protein
	SCO1527	0.697	4.64E-02	membrane transferase
	SCO4648	0.696	2.36E-02	50S ribosomal protein L11
	SCO5425	0.695	7.20E-03	phosphate acetyltransferase
	SCO3807	0.692	8.25E-03	hydrolase
	SCO5195	0.692	4.52E-02	hypothetical protein
	SCO1714	0.690	1.74E-02	hypothetical protein
	SCO2116	0.689	1.74E-02	hypothetical protein
	SCO4838	0.688	3.92E-03	hypothetical protein
	SCO2061	0.688	2.81E-02	ABC transport ATP-binding subunit
	SCO6451	0.688	8.15E-03	substrate binding protein
	SCO6585	0.680	4.12E-02	succinyl-CoA synthetase subunit beta
	SCO4444	0.680	1.32E-02	glutathione peroxidase
	SCO2839	0.680	2.96E-03	lipoprotein
	SCO2276	0.677	2.94E-03	hypothetical protein
	SCO1653	0.677	1.70E-02	hypothetical protein
	SCO3093	0.676	3.76E-02	hydrolase
	SCO2616	0.676	3.63E-02	hypothetical protein
	SCO5203	0.675	3.13E-02	hypothetical protein
	SCO4524	0.675	4.67E-02	hypothetical protein
	SCO1481	0.670	2.13E-02	orotidine 5'-phosphate decarboxylase
	SCO4884	0.670	7.65E-03	lipoprotein
	SCO1399	0.668	3.34E-02	ATP/GTP-binding protein
	SCO3913	0.667	4.71E-02	hypothetical protein
	SCO5150	0.663	4.26E-02	sec-independent translocase
	SCO3358	0.663	4.58E-02	two-component system response regulator

	SCO6218	0.662	7.20E-03	phosphatase
	SCO6454	0.661	1.18E-02	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO2866	0.661	4.64E-02	hypothetical protein
	SCO0072	0.657	2.67E-03	hypothetical protein
	SCO4737	0.656	2.34E-02	hypothetical protein
	SCO5860	0.653	2.01E-02	SuhB protein
	SCO2892	0.648	1.04E-02	hypothetical protein
	SCO1776	0.645	2.17E-02	CTP synthetase
	SCO3182	0.644	4.94E-02	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
	SCO3044	0.644	1.01E-02	hypothetical protein
	SCO2505	0.642	6.10E-03	ABC-transporter metal-binding lipoprotein
	SCO7477	0.642	1.29E-02	hypothetical protein
	SCO1780	0.642	3.19E-02	DNA repair protein
	SCO2042	0.641	4.33E-02	hypothetical protein
	SCO4223	0.639	7.07E-04	AraC family transcription regulator
	SCO5862	0.639	2.58E-02	two-component regulator CutR
	SCO4904	0.639	1.03E-02	hypothetical protein
	SCO2158	0.638	1.77E-02	kinase
	SCO3378	0.637	4.65E-02	small membrane protein
	SCO7453	0.637	7.20E-03	hypothetical protein
	SCO4263	0.634	2.75E-04	transcriptional regulator
	SCO2837	0.634	4.37E-02	hypothetical protein
	SCO7459	0.634	2.70E-02	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO3111	0.632	2.15E-02	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO3080	0.630	5.06E-03	hypothetical protein
	SCO5458	0.630	2.45E-02	lipoprotein
	SCO4669	0.628	2.52E-03	hypothetical protein
	SCO1482	0.627	8.35E-03	dihydroorotate dehydrogenase 2
	SCO6773	0.625	5.39E-03	peptidase
	SCO6433	0.624	8.70E-03	hypothetical protein
	SCO6453	0.624	3.18E-02	transport permease
	SCO3359	0.622	1.86E-02	sensory histidine kinase contains hydrophobic membrane spanning regions
	SCO2085	0.622	3.05E-02	cell division protein
	SCO4947	0.622	1.22E-04	nitrate reductase subunit alpha NarG3
	SCO1124	0.621	4.86E-02	hypothetical protein
	SCO2060	0.620	3.99E-02	integral membrane transport protein

	SCO5672	0.619	4.95E-02	hypothetical protein
	SCO4925	0.618	4.45E-02	hypothetical protein
	SCO3722	0.617	1.16E-02	transcriptional regulator
	SCO2848	0.615	1.34E-02	hypothetical protein
	SCO4599	0.615	5.01E-02	NADH dehydrogenase subunit NuoA2
	SCO4013	0.612	4.50E-02	penicillin-binding protein
	SCO4068	0.609	4.00E-02	phosphoribosylamine--glycine ligase
	SCO7385	0.609	3.34E-02	hypothetical protein
	SCO0496	0.608	1.55E-02	iron-siderophore permease transmembrane protein
	SCO6091	0.608	2.00E-02	hypothetical protein
	SCO4909	0.607	4.39E-03	ATP-binding protein
	SCO1777	0.607	1.96E-02	hypothetical protein
	SCO0229	0.605	1.51E-02	short chain dehydrogenase
	SCO7462	0.603	1.56E-02	hypothetical protein
	SCO5155	0.598	6.50E-03	lipoprotein
	SCO2057	0.589	3.19E-02	hypothetical protein
	SCO4493	0.589	4.65E-02	transcription regulator AsnC
	SCO3612	0.588	1.49E-02	hypothetical protein
	SCO1245	0.587	3.12E-02	adenosylmethionine--8-amino-7-oxononanoate aminotransferase BioA
	SCO0688	0.586	3.49E-03	hypothetical protein
	SCO5116	0.586	3.47E-02	peptide transport system ATP-binding subunit
	SCO5144	0.585	3.31E-02	acyl CoA isomerase
	SCO6436	0.584	2.52E-02	tRNA synthetase
	SCO0918	0.583	1.45E-03	excinuclease ABC subunit A
	SCO1698	0.583	3.08E-02	hypothetical protein
	SCO3896	0.582	2.53E-02	RNA nucleotidyltransferase
	SCO4590	0.581	1.94E-02	hypothetical protein
	SCO6432	0.580	9.86E-03	peptide synthase
	SCO2287	0.580	2.34E-02	oxidoreductase
	SCO4184	0.580	2.63E-02	aerial mycelium formation protein
	SCO3577	0.577	2.73E-02	ion-transporting ATPase
	SCO1115	0.576	3.52E-02	hypothetical protein
	SCO2516	0.576	7.20E-03	hypothetical protein
	SCO4047	0.574	4.85E-02	hypothetical protein
	SCO3311	0.572	1.04E-02	delta-aminolevulinic acid dehydratase
	SCO4993	0.566	6.70E-04	metal ion transport protein

	SCO3149	0.559	2.74E-02	dimethyladenosine transferase
	SCO3046	0.558	8.34E-03	hypothetical protein
	SCO4059	0.557	2.25E-02	transcriptional regulator
	SCO1337	0.554	2.80E-02	oxidoreductase
	SCO6462	0.550	3.34E-02	methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase
	SCO2939	0.550	2.73E-02	hypothetical protein
	SCO6140	0.549	4.25E-02	two-component system response regulator
	SCO4171	0.548	3.39E-02	hypothetical protein
	SCO2175	0.538	2.35E-02	nicotinate-nucleotide--dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase
	SCO3282	0.536	1.83E-02	precorrin-8X methylmutase
	SCO1826	0.534	4.07E-02	hypothetical protein
	SCO5138	0.532	3.19E-02	hypothetical protein
	SCO3864	0.532	3.53E-02	transcriptional regulator
	SCO2334	0.531	2.65E-02	hypothetical protein
	SCO3176	0.531	1.01E-02	hypothetical protein
	SCO4752	0.528	3.93E-02	DNA-binding/iron metalloprotein/AP endonuclease
	SCO0465	0.527	3.12E-02	non-heme chloroperoxidase
	SCO3703	0.526	2.45E-02	substrate binding protein
	SCO4747	0.526	3.12E-02	ATP/GTP binding protein
	SCO1101	0.525	2.90E-02	hypothetical protein
	SCO3868	0.519	3.96E-02	hypothetical protein
	SCO6687	0.518	6.79E-03	DNA-binding protein
	SCO4740	0.511	1.57E-02	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase
	SCO2897	0.505	3.41E-02	penicillin-binding protein
	SCO4850	0.501	2.27E-02	TetR family transcriptional regulator
downregulated	SCO0171	-0.504	2.33E-02	nicotinate phosphoribosyltransferase
	SCO5005	-0.505	4.39E-02	hypothetical protein
	SCO4290	-0.505	7.55E-03	trehalose-phosphate synthase
	SCO3656	-0.509	8.14E-03	hypothetical protein
	SCO5442	-0.517	6.59E-03	trehalose synthase
	SCO1369	-0.521	2.56E-02	two component system histidine kinase
	SCO1568	-0.521	3.65E-02	TetR family transcriptional regulator
	SCO6110	-0.522	2.99E-02	sugar kinase
	SCO4571	-0.523	2.53E-02	NADH dehydrogenase subunit J

	SCO6029	-0.525	4.52E-02	two-component regulator
	SCO6359	-0.525	2.32E-02	hypothetical protein
	SCO4976	-0.530	4.98E-03	hypothetical protein
	SCO2883	-0.531	4.61E-02	cytochrome P450
	SCO1198	-0.535	3.38E-02	acyl-CoA dehydrogenase
	SCO5028	-0.535	2.31E-03	ATP-binding protein
	SCO7519	-0.542	2.27E-02	sugar acetyltransferase
	SCO1889	-0.545	1.79E-02	dihydropicolinate synthase
	SCO3007	-0.548	3.52E-03	hypothetical protein
	SCO5629	-0.548	4.33E-04	ATP /GTP-binding protein
	SCO1817	-0.550	1.47E-02	hypothetical protein
	SCO1085	-0.550	3.39E-02	acyltransferase
	SCO5929	-0.552	2.36E-02	oxidoreductase
	SCO0985	-0.553	5.60E-03	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate/homocysteine S-methyltransferase
	SCO3104	-0.554	2.10E-04	hypothetical protein
	SCO4630	-0.554	1.65E-02	hypothetical protein
	SCO0972	-0.558	2.94E-02	transposase remnant
	SCO2827	-0.559	8.81E-04	hypothetical protein
	SCO4237	-0.559	3.50E-02	hypothetical protein
	SCO6394	-0.559	9.15E-03	IS element ATP binding protein
	SCO0198	-0.559	4.66E-02	hypothetical protein
	SCO1981	-0.560	2.24E-02	hypothetical protein
	SCO5975	-0.561	1.01E-02	arginine deiminase
	SCO7367	-0.562	3.52E-03	membrane efflux protein
	SCO6504	-0.563	5.85E-03	hypothetical protein
	SCO7842	-0.564	3.65E-03	transposase
	SCO3383	-0.570	1.83E-02	pantoate--beta-alanine ligase
	SCO3119	-0.571	1.14E-02	hypothetical protein
	SCO0073	-0.571	3.48E-02	hypothetical protein
	SCO4565	-0.573	3.04E-03	NADH dehydrogenase subunit D
	SCO0005	-0.573	2.86E-03	transposase
	SCO0617	-0.574	8.86E-03	phosphoketolase
	SCO3350	-0.574	3.51E-02	hypothetical protein
	SCO2524	-0.575	3.85E-02	hypothetical protein
	SCO5801	-0.575	2.88E-02	hypothetical protein

	SCO1630	-0.575	1.92E-02	hypothetical protein
	SCO0149	-0.578	3.83E-02	hypothetical protein
	SCO0203	-0.580	1.51E-02	two-component sensor
	SCO6809	-0.581	4.39E-02	integral membrane transport protein
	SCO2529	-0.582	1.52E-03	metalloprotease
	SCO1648	-0.582	3.09E-02	ATPase AAA
	SCO0428	-0.583	4.31E-02	tetR family transcriptional regulator
	SCO2924	-0.585	2.73E-02	regulator
	SCO6777	-0.586	7.62E-03	beta-lactamase
	SCO6808	-0.586	1.79E-02	transcription regulator ArsR
	SCO6211	-0.587	6.48E-03	uricase
	SCO4609	-0.588	3.18E-02	heat shock protein HtpX
	SCO0588	-0.591	7.65E-03	sensor kinase
	SCO6519	-0.593	1.45E-02	lyase
	SCO1489	-0.596	4.75E-02	DNA-binding protein
	SCO6305	-0.601	7.20E-03	hypothetical protein
	SCO0208	-0.602	3.60E-04	pyruvate phosphate dikinase
	SCO0855	-0.603	4.16E-02	acetyltransferase
	SCP2.02	-0.604	1.46E-03	putative is1648 transposase
	SCO1627	-0.607	3.13E-02	ATP-GTP binding protein
	SCO5578	-0.608	2.24E-02	sugar transporter
	SCO4006	-0.609	1.77E-04	long-chain-fatty-acid--CoA ligase
	SCO0210	-0.614	4.68E-02	hypothetical protein
	SCO5221	-0.615	7.54E-04	polypeptide deformylase
	SCO7011	-0.617	1.83E-02	membrane transport protein
	SCO0166	-0.617	1.10E-02	regulator
	SCO1143	-0.617	4.93E-02	hypothetical protein
	SCO1726	-0.619	1.18E-03	ATPase
	SCO4784	-0.621	3.19E-02	hypothetical protein
	SCO1796	-0.623	1.56E-02	hypothetical protein
	SCO5024	-0.623	2.20E-02	oxidoreductase
	SCO2655	-0.625	2.80E-02	hypothetical protein
	SCO1404	-0.630	1.39E-02	hypothetical protein
	SCO0784	-0.631	3.09E-02	hypothetical protein
	SCO2108	-0.633	3.41E-02	hypothetical protein
	SCO4279	-0.634	1.50E-02	acetyltransferase
	SCO7153	-0.635	1.03E-02	sugar transporter

	SCO0907	-0.638	6.48E-03	dehydrogenase
	SCO4092	-0.641	7.67E-03	ATP-dependent helicase
	SCO6354	-0.642	2.01E-03	two-component regulator
	SCO2649	-0.642	1.16E-05	4-alpha-glucanotransferase
	SCO4131	-0.643	4.80E-04	hypothetical protein
	SCO7722	-0.645	7.65E-03	hypothetical protein
	SCO6464	-0.646	1.48E-02	SIR2 family transcriptional regulator
	SCO5506	-0.647	2.72E-06	regulatory protein
	SCO1322	-0.652	3.39E-03	hypothetical protein
	SCO5700	-0.653	4.83E-03	kinase
	SCO6055	-0.654	2.27E-02	carbonic anhydrase
	SCO6094	-0.655	4.65E-02	transport system integral membrane protein
	SCO2520	-0.657	1.90E-03	hypothetical protein
	SCO4690	-0.657	3.34E-03	hypothetical protein
	SCO3206	-0.657	3.58E-03	transmembrane efflux protein
	SCO5222	-0.657	6.41E-04	lyase
	SCO4610	-0.658	4.14E-05	hypothetical protein
	SCO4689	-0.660	3.81E-03	hypothetical protein
	SCO6811	-0.661	3.33E-02	hypothetical protein
	SCO1657	-0.662	3.47E-02	methionine synthase
	SCO2697	-0.664	4.37E-02	hypothetical protein
	SCO2465	-0.666	8.52E-03	RNA polymerase principal sigma factor
	SCO1108	-0.667	1.03E-02	regulatory protein
	SCO5511	-0.669	2.97E-02	membrane associated phophodiesterase
	SCO4679	-0.669	5.13E-03	hypothetical protein
	SCO0181	-0.672	9.05E-04	hypothetical protein
	SCO4207	-0.672	3.45E-02	hypothetical protein
	SCO3284	-0.673	1.82E-05	hypothetical protein
	SCO0220	-0.675	1.55E-02	hypothetical protein
	SCO2449	-0.677	3.55E-03	hypothetical protein
	SCO4594	-0.679	8.02E-04	2-oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase subunit beta
	SCO4676	-0.681	4.27E-03	hypothetical protein
	SCO0177	-0.682	3.34E-03	hypothetical protein
	SCO3928	-0.683	2.93E-02	thiamine biosynthesis protein ThiC
	SCO3826	-0.687	1.06E-04	ion channel membrane protein
	SCO0219	-0.688	9.15E-03	nitrate reductase subunit delta NarI2

	SCO2372	-0.690	4.71E-02	small hydrophobic protein
	SCO0906	-0.690	2.70E-02	hypothetical protein
	SCO0834	-0.690	3.06E-03	hypothetical protein
	SCO4563	-0.691	1.70E-02	NADH dehydrogenase subunit B
	SCO4308	-0.692	7.54E-04	transcriptional regulator
	SCO6228	-0.694	8.08E-03	hypothetical protein
	SCO5250	-0.697	9.84E-04	polyprenyl synthetase
	SCO6981	-0.698	1.57E-03	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO4245	-0.703	2.09E-05	hypothetical protein
	SCO2920	-0.706	1.34E-02	protease
	SCO6805	-0.708	2.29E-04	integral membrane efflux protein
	SCO1963	-0.708	6.08E-03	integral membrane export protein
	SCO1647	-0.711	2.31E-03	hypothetical protein
	SCO2877	-0.711	1.90E-02	hypothetical protein
	SCO4222	-0.712	1.52E-03	hypothetical protein
	SCO1927	-0.712	8.97E-04	AAC(3) family N-acetyltransferase
	SCO5252	-0.713	2.39E-02	hypothetical protein
	SCO0215	-0.714	6.68E-05	hypothetical protein
	SCO7205	-0.717	1.62E-03	hydrolase
	SCO3340	-0.719	1.72E-03	hypothetical protein
	SCO7366	-0.720	2.17E-02	hypothetical protein
	SCO7016	-0.722	3.06E-04	LacI family transcriptional regulator
	SCO7700	-0.722	9.32E-03	cyclase
	SCO5207	-0.727	9.10E-03	hypothetical protein
	SCO5166	-0.729	9.13E-03	helicase
	SCO6108	-0.730	1.24E-02	esterase
	SCO1812	-0.730	4.06E-05	integral membrane transporter
	SCO2383	-0.730	2.85E-03	hypothetical protein
	SCO0921	-0.732	1.54E-03	hypothetical protein
	SCO1406	-0.732	3.04E-03	hypothetical protein
	SCO6353	-0.734	4.83E-05	two-component sensor
	SCO3165	-0.735	2.36E-03	hypothetical protein
	SCO6269	-0.735	5.43E-05	2-oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase subunit beta
	SCO4564	-0.736	1.90E-03	NADH dehydrogenase subunit C
	SCO7468	-0.737	9.55E-04	flavin-binding monooxygenase
	SCO6096	-0.742	2.72E-02	lipoprotein

	SCO1903	-0.743	3.34E-03	transport associated protein
	SCO3765	-0.748	1.06E-03	hypothetical protein
	SCO6222	-0.755	1.15E-04	aminotransferase AlaT
	SCO1134	-0.757	1.92E-03	oxidoreductase%2C iron-sulfur binding subunit
	SCO5174	-0.758	3.60E-04	transferase
	SCO7609	-0.769	2.59E-03	esterase
	SCO4070	-0.772	6.86E-03	hypothetical protein
	SCO6663	-0.774	5.21E-04	transketolase
	SCO3952	-0.776	2.86E-03	hypothetical protein
	SCO5025	-0.776	3.78E-04	transcriptional regulator
	SCO7651	-0.777	9.79E-04	TetR family transcriptional regulator
	SCO2496	-0.780	3.10E-03	hypothetical protein
	SCO1132	-0.784	6.32E-07	oxidoreductase
	SCO5811	-0.785	4.28E-05	transcriptional regulator
	SCO4347	-0.788	6.59E-07	hypothetical protein
	SCO5010	-0.790	1.68E-05	hypothetical protein
	SCO3607	-0.792	8.96E-03	hypothetical protein
	SCO5107	-0.794	1.56E-03	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
	SCO6952	-0.794	7.86E-04	hypothetical protein
	SCO4188	-0.797	3.21E-06	GntR family transcriptional regulator
	SCO5175	-0.798	2.64E-05	hypothetical protein
	SCO0174	-0.804	1.72E-04	DNA-binding protein
	SCO1968	-0.805	1.05E-03	hydrolase
	SCO6513	-0.806	2.76E-04	hypothetical protein
	SCO7434	-0.807	7.53E-04	lipoprotein
	SCO2464	-0.811	3.50E-07	ABC transporter
	SCO1567	-0.812	1.06E-05	transmembrane-transport protein
	SCO0200	-0.816	6.44E-03	hypothetical protein
	SCO0585	-0.819	2.75E-04	ATP/GTP binding protein
	SCO6073	-0.827	5.04E-05	cyclase
	SCO3035	-0.828	1.29E-03	hypothetical protein
	SCO3366	-0.828	2.67E-03	exporter
	SCO0204	-0.829	4.75E-03	LuxR family transcriptional regulator
	SCO1799	-0.829	1.27E-05	hypothetical protein
	SCO5004	-0.831	2.02E-04	hypothetical protein
	SCO7841	-0.832	3.00E-04	ATP/GTP-binding protein
	SCO1474	-0.839	1.21E-03	hypothetical protein

	SCO2466	-0.839	1.02E-02	hypothetical protein
	SCO0622	-0.839	1.14E-03	TetR family transcriptional regulator
	SCO3360	-0.840	9.42E-06	hypothetical protein
	SCO2625	-0.840	3.07E-06	hypothetical protein
	SCO1867	-0.847	2.84E-03	hydroxylase
	SCO5015	-0.853	7.55E-05	hypothetical protein
	SCO0685	-0.853	1.89E-03	hypothetical protein
	SCO3764	-0.856	2.12E-08	hypothetical protein
	SCO0217	-0.858	6.76E-05	nitrate reductase subunit beta NarH2
	SCO5473	-0.860	8.96E-04	ATP/GTP binding protein
	SCO7652	-0.861	6.08E-03	acetyltransferase
	SCO1624	-0.866	6.44E-04	acetyltransferase
	SCO0993	-0.866	8.19E-06	hypothetical protein
	SCO0006	-0.867	1.14E-04	ATP/GTP-binding protein
	SCO6304	-0.868	4.26E-05	oxidoreductase
	SCO2765	-0.868	5.72E-05	hypothetical protein
	SCO1457	-0.869	2.14E-04	transporter
	SCO3606	-0.869	9.44E-04	regulator
	SCO0525	-0.873	1.75E-03	hypothetical protein
	SCO3601	-0.875	1.50E-05	hypothetical protein
	SCO6099	-0.878	2.46E-03	adenylyl-sulfate kinase
	SCO1987	-0.879	4.35E-03	hypothetical protein
	SCO7447	-0.884	5.07E-04	acetyltranferase
	SCO1866	-0.885	2.40E-03	L-ectoine synthase
	SCO1988	-0.890	2.14E-04	hypothetical protein
	SCO0199	-0.890	2.04E-04	alcohol dehydrogenase
	SCO1307	-0.893	1.59E-04	hypothetical protein
	SCO5448	-0.903	1.61E-02	ABC transporter
	SCO2343	-0.903	7.47E-05	acetyltransferase
	SCO2016	-0.904	8.15E-07	monooxygenase
	SCO1816	-0.906	8.28E-07	hypothetical protein
	SCO4164	-0.914	8.10E-04	thiosulfate sulfurtransferase
	SCO4311	-0.917	2.75E-06	hypothetical protein
	SCO3323	-0.919	1.35E-05	RNA polymerase sigma factor
	SCO2113	-0.921	4.98E-03	bacterioferritin
	SCO2911	-0.922	1.62E-05	hypothetical protein
	SCO4337	-0.924	5.55E-05	integral membrane efflux protein

	SCO2236	-0.925	1.60E-04	hypothetical protein
	SCO0924	-0.927	7.62E-03	cytochrome B subunit
	SCO5861	-0.927	5.57E-05	hypothetical protein
	SCO2117	-0.929	8.24E-08	anthranilate synthase
	SCO3296	-0.931	3.52E-03	oxidoreductase
	SCO7014	-0.933	4.13E-06	LacI family transcriptional regulator
	SCO1144	-0.934	5.70E-08	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO7709	-0.937	8.37E-06	MarR family transcriptional regulator
	SCO2248	-0.939	2.61E-05	hypothetical protein
	SCO6102	-0.939	2.96E-03	nitrite/sulfite reductase
	SCO1569	-0.949	1.05E-03	oxidoreductase
	SCO3277	-0.950	3.33E-04	phosphotransferase
	SCO5006	-0.952	1.37E-07	septum site-determining protein
	SCO4468	-0.957	9.92E-04	hypothetical protein
	SCO6097	-0.962	4.68E-04	sulfate adenylyltransferase subunit 1
	SCO1083	-0.968	1.34E-04	flavin-dependent reductase
	SCO0922	-0.973	1.82E-04	succinate dehydrogenase/fumarate reductase iron-sulfur subunit
	SCO0991	-0.977	3.55E-04	hypothetical protein
	SCO5177	-0.979	2.88E-05	hypothetical protein
	SCO1405	-0.986	2.52E-07	HSP90 family protein
	SCO2463	-0.987	5.44E-05	ABC transporter
	SCO5949	-0.987	1.78E-05	hypothetical protein
	SCO1545	-0.987	2.75E-04	acetyltransferase
	SCO1731	-0.990	2.09E-07	hypothetical protein
	SCO7265	-1.002	6.31E-05	hypothetical protein
	SCO5774	-1.004	2.55E-06	glutamate permease
	SCO1673	-1.007	2.10E-04	hypothetical protein
	SCO0908	-1.008	7.81E-06	hypothetical protein
	SCO0216	-1.020	3.79E-07	nitrate reductase subunit alpha NarG2
	SCO0213	-1.021	3.59E-07	nitrate/nitrite transporter
	SCO2311	-1.024	2.74E-09	hypothetical protein
	SCO6446	-1.032	1.26E-08	hypothetical protein
	SCO0587	-1.033	2.27E-05	hypothetical protein
	SCO2876	-1.038	6.98E-08	acetyltransferase
	SCO7507	-1.039	1.16E-06	dioxygenase
	SCO6098	-1.039	1.03E-04	sulfate adenylyltransferase subunit 2

	SCO7653	-1.045	1.05E-03	hypothetical protein
	SCO7197	-1.048	5.21E-10	amino acid ABC transporter permease
	SCO1586	-1.056	2.61E-06	hypothetical protein
	SCO1133	-1.059	1.75E-08	oxidoreductase%2C molybdopterin binding subunit
	SCO6517	-1.064	3.56E-07	uvrA-like protein
	SCO5249	-1.068	3.11E-07	nucleotide-binding protein
	SCO1341	-1.070	2.23E-06	lipoprotein
	SCO1148	-1.076	7.34E-13	ABC transporter
	SCO3132	-1.078	1.35E-05	trans-aconitate 2-methyltransferase
	SCO3788	-1.083	5.50E-04	hypothetical protein
	SCO6797	-1.086	9.37E-07	ATP/GTP binding protein
	SCO3917	-1.090	3.00E-08	hypothetical protein
	SCO2027	-1.091	5.54E-09	hypothetical protein
	SCO6100	-1.096	1.15E-04	phosphoadenosine phosphosulfate reductase
	SCO0995	-1.100	3.00E-04	methyltransferase
	SCO3631	-1.101	3.62E-06	hypothetical protein
	SCO2591	-1.103	1.77E-04	hypothetical protein
	SCO0186	-1.113	3.94E-04	phytoene dehydrogenase
	SCO4964	-1.121	1.68E-10	integral membrane transport protein
	SCO6149	-1.123	2.74E-09	ribosome-associated GTPase
	SCO5009	-1.124	2.63E-10	secretory protein
	SCO0185	-1.126	4.70E-03	geranylgeranyl pyrophosphate synthase
	SCO3562	-1.135	2.41E-16	integral membrane transport protein
	SCO2912	-1.144	2.23E-05	hypothetical protein
	SCO0218	-1.148	1.96E-07	nitrate reductase subunit delta NarJ2
	SCO1585	-1.152	5.25E-05	hypothetical protein
	SCO0796	-1.154	8.76E-10	hypothetical protein
	SCO0190	-1.161	4.90E-06	methyltransferase
	SCO1557	-1.168	2.88E-05	lipoprotein
	SCO5176	-1.171	2.17E-08	reductase
	SCO3608	-1.187	4.11E-04	hypothetical protein
	SCO0586	-1.197	1.47E-07	hypothetical protein
	SCO2527	-1.201	3.82E-11	hypothetical protein
	SCO4963	-1.204	9.92E-08	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO1729	-1.209	5.73E-10	hypothetical protein
	SCO2379	-1.221	6.36E-09	acetyltransferase
	SCO7710	-1.229	5.55E-11	phosphotransferase

	SCO0187	-1.239	2.75E-04	phytoene synthase
	SCO4007	-1.256	1.81E-16	hypothetical protein
	SCO1576	-1.270	3.09E-05	arginine repressor
	SCO3287	-1.288	4.37E-04	serine/arginine rich protein
	SCO2755	-1.291	3.77E-09	acetyltransferase
	SCO2213	-1.294	7.51E-07	regulatory protein
	SCO0994	-1.308	4.72E-15	hypothetical protein
	SCO5449	-1.316	2.52E-14	ABC transporter
	SCO5190	-1.323	2.64E-12	DNA-binding protein
	SCO4055	-1.325	2.33E-17	alcohol dehydrogenase
	SCO5974	-1.329	6.20E-05	integral membrane ion exchanger
	SCO1986	-1.331	2.96E-06	hypothetical protein
	SCO3602	-1.335	4.75E-18	transmembrane transport protein
	SCO3006	-1.336	9.49E-16	acetyltransferase
	SCO5450	-1.356	2.37E-22	ABC transporter
	SCO1577	-1.356	2.03E-06	acetylornithine aminotransferase
	SCO7606	-1.356	8.83E-11	amino acid binding protein
	SCO6512	-1.357	8.83E-13	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO4765	-1.362	2.10E-13	hypothetical protein
	SCO2373	-1.393	5.43E-08	tetracenomycin C efflux protein
	SCO6056	-1.396	2.29E-12	hypothetical protein
	SCO7731	-1.409	1.54E-13	hypothetical protein
	SCO0593	-1.416	1.55E-12	hypothetical protein
	SCO4278	-1.435	1.02E-12	peptidyl-tRNA hydrolase domain-containing protein
	SCO5772	-1.445	1.84E-09	hypothetical protein
	SCO6295	-1.445	1.73E-21	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO6447	-1.451	4.48E-11	NAD(P)H oxidoreductase
	SCO7036	-1.452	1.12E-07	argininosuccinate synthase
	SCO5191	-1.453	3.68E-10	hypothetical protein
	SCO4264	-1.463	1.18E-23	aminoglycoside phosphotransferase
	SCO2247	-1.473	2.52E-13	hypothetical protein
	SCO0909	-1.483	1.18E-09	hypothetical protein
	SCO5189	-1.514	1.52E-08	hypothetical protein
	SCO1084	-1.516	2.93E-12	thioredoxin
	SCO3286	-1.531	1.04E-14	hypothetical protein
	SCO7478	-1.553	2.58E-13	phosphotransferase
	SCO4054	-1.554	9.92E-08	hypothetical protein

	SCO3710	-1.557	1.93E-11	large integral membrane protein
	SCO1147	-1.573	1.64E-27	ABC transporter transmembrane subunit
	SCO0408	-1.575	2.56E-13	methyltransferase
	SCO1570	-1.583	2.57E-11	argininosuccinate lyase
	SCO7806	-1.595	9.16E-10	DNA-binding protein
	SCO4293	-1.596	4.54E-16	threonine synthase
	SCO7721	-1.624	1.01E-24	hypothetical protein
	SCO1559	-1.654	2.30E-09	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO5796	-1.676	2.12E-10	hypothetical protein
	SCO1578	-1.680	2.71E-10	acetylglutamate kinase
	SCO0992	-1.682	4.84E-23	cysteine synthase
	SCO3953	-1.712	2.19E-26	RNA 2'-phosphotransferase-like protein
	SCO1340	-1.724	1.43E-14	hypothetical protein
	SCO5977	-1.766	4.70E-37	amino acid permease
	SCO5972	-1.815	1.25E-27	3' terminal RNA ribose 2'-O-methyltransferase Hen1
	SCO0106	-1.851	8.92E-14	insertion element transposase
	SCO5976	-1.870	9.23E-20	ornithine carbamoyltransferase
	SCO0854	-1.877	3.59E-22	hypothetical protein
	SCO2145	-1.915	5.93E-16	glycerate kinase
	SCO1575	-1.952	3.70E-29	thiamine biosynthesis lipoprotein
	SCO1579	-1.964	5.31E-20	bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase
	SCO3711	-1.967	1.88E-20	small membrane protein
	SCO5973	-1.977	7.81E-36	phosphatase
	SCO1558	-1.993	2.38E-27	ABC transporter permease
	SCO1580	-1.995	1.37E-15	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
	SCO0795	-1.999	1.27E-28	hypothetical protein
	SCO5451	-2.054	4.52E-32	ABC transporter
	SCO6530	-2.086	7.64E-28	hypothetical protein
	SCO1413	-2.094	2.11E-33	hypothetical protein
	SCO3824	-2.164	4.35E-36	ABC transporter ATP-binding protein
	SCO3825	-2.225	7.30E-38	ABC-transporter transmembrane protein
	SCO3299	-2.243	9.96E-30	hypothetical protein
	SCO3285	-2.326	1.42E-56	large glycine/alanine rich protein
	SCO1905	-2.326	6.71E-52	hypothetical protein
	SCO2146	-2.389	2.53E-30	aminotransferase
	SCO0783	-2.467	1.64E-46	tetracycline resistance protein

	SCO6529	-2.576	2.74E-37	ATP/GTP binding protein
	SCO1086	-2.794	2.97E-30	hypothetical protein

図表 S16　S15 における DEG (0h vs 2h) に対する GSEA 解析結果のリスト

Class	GO term	Genes list
Biorogical process	Peptidoglycan biosynthetic process	SCO3811
	p-value: 0.0044	SCO4439
		SCO4847
		SCO2949
		SCO2089
		SCO2088
	translation	SCO3906
	p-value: 0.03	SCO4716
		SCO4652
		SCO4713
		SCO3124
		SCO4710
		SCO4635
		SCO3880
		SCO3909
		SCO1211
	protein phosphorylation	SCO2110
	p-value: 0.089	SCO3820
		SCO4779
		SCO6681
		SCO3621
Pathway	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	SCO3397
	p-value: 0.0000081	SCO6436
		SCOt08
		SCOt11
		SCOt17
		SCOt19

		SCOt31
		SCOt36
		SCOt40
		SCOt44
		SCOt48
		SCOt50
		SCOt51
		SCOt56
		SCOt57
		SCOt58
		SCOt59
		SCOt60
		SCOt24
		SCOt05
		SCOt06
	Nicotinate and nicotinamide metabolism	SCO5754
	p-value: 0.047	SCO2918
		SCO2917
		SCO2579
		SCO2162
Keywords	Cytoplasm	SCO3885
	p-value: 0.000096	SCO1643
		SCO1644
		SCO5285
		SCO5190
		SCO4752
		SCO3356
		SCO2595
		SCO2092
		SCO2949
		SCO2089
		SCO2088

		SCO1514
		SCO3879
		SCO4684
		SCO1996
		SCO5793
		SCO6589
		SCO1749
		SCO4923
		SCO2193
		SCO4228
		SCO4979
		SCO1391
		SCO5568
		SCO2162
		SCO3579
		SCO7284
		SCO3034
		SCO6715
		SCO4725
		SCO1600
		SCO3358
		SCO1114
		SCO6031
		SCO4089
		SCO1169
	Membrane	SCO1806
	p-value: 0.01	SCO4240
		SCO6683
		SCO5112
		SCO5114
		SCO2258
		SCO3110

		SCO5392
		SCO1720
		SCO5734
		SCO4847
		SCO2595
		SCO2110
		SCO3820
		SCO2628
		SCO1659
		SCO0609
		SCO1319
		SCO1323
		SCO1385
		SCO1386
		SCO1540
		SCO1543
		SCO1562
		SCO1700
		SCO1941
		SCO2041
		SCO2066
		SCO2067
		SCO2078
		SCO2097
		SCO2366
		SCO2456
		SCO2648
		SCO2663
		SCO2807
		SCO2837
		SCO2892
		SCO2960

		SCO3045
		SCO3048
		SCO3061
		SCO3074
		SCO3145
		SCO3288
		SCO3357
		SCO3396
		SCO3612
		SCO3862
		SCO3870
		SCO3895
		SCO3898
		SCO3924
		SCO3959
		SCO4011
		SCO4012
		SCO4042
		SCO4172
		SCO4187
		SCO4225
		SCO4438
		SCO4524
		SCO4528
		SCO4529
		SCO4584
		SCO4669
		SCO4737
		SCO4782
		SCO4790
		SCO4903
		SCO4904

		SCO4924
		SCO5230
		SCO5358
		SCO5481
		SCO5504
		SCO5610
		SCO5659
		SCO5663
		SCO5664
		SCO5720
		SCO5742
		SCO5856
		SCO6091
		SCO6225
		SCO6430
		SCO6695
		SCO6728
		SCO6729
		SCO7536
		SCO7613
		SCO7646
		SCO1963
		SCO3397
		SCO1709
		SCO1710
		SCO6528
		SCO7596
		SCO3289
		SCO2725
		SCO4651
		SCO3166
		SCO5157

		SCO1944
		SCO3977
		SCO3359
		SCO4531
		SCO3621
		SCO1550
		SCO3378
		SCO5436
		SCO2455
		SCO2664
		SCO3925
		SCO6020
		SCO5575
		SCO5782
		SCO3580
		SCO5863
		SCO5784
		SCO4791
	Signal	SCO3110
	p-value: 0.016	SCO2505
		SCO3811
		SCO4847
		SCO2838
		SCO3342
		SCO7461
		SCO0072
		SCO0736
		SCO0974
		SCO1138
		SCO1940
		SCO2116
		SCO2516

		SCO2648
		SCO2663
		SCO2837
		SCO2903
		SCO3097
		SCO3098
		SCO3146
		SCO3357
		SCO3546
		SCO3760
		SCO3895
		SCO4002
		SCO4289
		SCO4424
		SCO5797
		SCO5798
		SCO5839
		SCO6224
		SCO6225
		SCO6592
		SCO6682
		SCO6973
		SCO7233
		SCO7477
		SCO7536
		SCO0607
		SCO2457
		SCO2725
		SCO2839
		SCO3086
		SCO3106
		SCO3194

		SCO4651
		SCO4884
		SCO4885
		SCO5458
		SCO6005
		SCO7393
		SCO3166
		SCO6723
		SCO1875
		SCO5179
		SCO5660
		SCO6773
		SCO1639
		SCO4037
		SCO3704
	Transmembrane	SCO1806
	p-value: 0.019	SCO6683
		SCO5112
		SCO5114
		SCO2258
		SCO3110
		SCO5392
		SCO1720
		SCO5734
		SCO4847
		SCO2110
		SCO3820
		SCO2628
		SCO1659
		SCO0609
		SCO1319
		SCO1323

		SCO1385
		SCO1386
		SCO1540
		SCO1543
		SCO1562
		SCO1700
		SCO1941
		SCO2041
		SCO2066
		SCO2067
		SCO2078
		SCO2097
		SCO2366
		SCO2456
		SCO2648
		SCO2663
		SCO2807
		SCO2837
		SCO2892
		SCO2960
		SCO3045
		SCO3048
		SCO3061
		SCO3074
		SCO3145
		SCO3288
		SCO3396
		SCO3612
		SCO3862
		SCO3870
		SCO3895
		SCO3898

		SCO3924
		SCO3959
		SCO4011
		SCO4012
		SCO4042
		SCO4172
		SCO4187
		SCO4225
		SCO4438
		SCO4524
		SCO4528
		SCO4529
		SCO4584
		SCO4669
		SCO4737
		SCO4782
		SCO4790
		SCO4903
		SCO4904
		SCO4924
		SCO5230
		SCO5358
		SCO5481
		SCO5504
		SCO5610
		SCO5659
		SCO5663
		SCO5664
		SCO5720
		SCO5742
		SCO5856
		SCO6091

		SCO6225
		SCO6430
		SCO6695
		SCO6728
		SCO6729
		SCO7536
		SCO7613
		SCO7646
		SCO1963
		SCO3397
		SCO1709
		SCO1710
		SCO6528
		SCO7596
		SCO3289
		SCO3166
		SCO5157
		SCO1944
		SCO3977
		SCO3359
		SCO4531
		SCO3621
		SCO1550
		SCO3378
		SCO5436
		SCO2455
		SCO2664
		SCO3925
		SCO6020
		SCO5575
		SCO5782
		SCO3580

		SCO5863
		SCO5784
		SCO4791
	Transmembrane helix	SCO1806
	p-value: 0.019	SCO6683
		SCO5112
		SCO5114
		SCO2258
		SCO3110
		SCO5392
		SCO1720
		SCO5734
		SCO4847
		SCO2110
		SCO3820
		SCO2628
		SCO1659
		SCO0609
		SCO1319
		SCO1323
		SCO1385
		SCO1386
		SCO1540
		SCO1543
		SCO1562
		SCO1700
		SCO1941
		SCO2041
		SCO2066
		SCO2067
		SCO2078
		SCO2097

		SCO2366
		SCO2456
		SCO2648
		SCO2663
		SCO2807
		SCO2837
		SCO2892
		SCO2960
		SCO3045
		SCO3048
		SCO3061
		SCO3074
		SCO3145
		SCO3288
		SCO3396
		SCO3612
		SCO3862
		SCO3870
		SCO3895
		SCO3898
		SCO3924
		SCO3959
		SCO4011
		SCO4012
		SCO4042
		SCO4172
		SCO4187
		SCO4225
		SCO4438
		SCO4524
		SCO4528
		SCO4529

		SCO4584
		SCO4669
		SCO4737
		SCO4782
		SCO4790
		SCO4903
		SCO4904
		SCO4924
		SCO5230
		SCO5358
		SCO5481
		SCO5504
		SCO5610
		SCO5659
		SCO5663
		SCO5664
		SCO5720
		SCO5742
		SCO5856
		SCO6091
		SCO6225
		SCO6430
		SCO6695
		SCO6728
		SCO6729
		SCO7536
		SCO7613
		SCO7646
		SCO1963
		SCO3397
		SCO1709
		SCO1710

		SCO6528
		SCO7596
		SCO3289
		SCO3166
		SCO5157
		SCO1944
		SCO3977
		SCO3359
		SCO4531
		SCO3621
		SCO1550
		SCO3378
		SCO5436
		SCO2455
		SCO2664
		SCO3925
		SCO6020
		SCO5575
		SCO5782
		SCO3580
		SCO5863
		SCO5784
		SCO4791
	RNA binding	SCO3906
	p-value: 0.03	SCO4716
		SCO4652
		SCO4713
		SCO3124
		SCO3909
		SCO3896
		SCO3881
		SCO4725

	Lipoprotein	SCO2505
	p-value: 0.034	SCO3357
		SCO2457
		SCO2725
		SCO2839
		SCO3086
		SCO3106
		SCO3194
		SCO4651
		SCO4884
		SCO4885
		SCO5458
		SCO6005
		SCO7393
		SCO7460
	rRNA binding	SCO3906
	p-value: 0.037	SCO4716
		SCO4652
		SCO4713
		SCO3124
		SCO3909
		SCO4725
	Ribosomal protein	SCO3906
	p-value: 0.039	SCO4716
		SCO4652
		SCO4713
		SCO3124
		SCO4710
		SCO4635
		SCO3880
		SCO3909
	Ribonuleoprotein	SCO3906

	p-value: 0.043	SCO4716
		SCO4652
		SCO4713
		SCO3124
		SCO4710
		SCO4635
		SCO3880
		SCO3909