



Precise Metabolic Flux Analysis of Coryneform Bacteria by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Verification by Nuclear Magnetic Resonance

ガスクロマトグラフ-質量分析計によるコリネ型細菌の精密な代謝フラックス解析と核磁気共鳴を用いた解析結果の検証

(JBB, Vol. 102, No. 5, 413-424, 2006)

白井 智量^{1a}・松崎 匡浩²・葛本 雅宣²・永久 圭介²
古澤 力²・塩谷 捨明¹・清水 浩^{2*}

微生物を用いた“ものづくり”にとって、生産性向上を目指した細胞育種は必須の技術である。その際に重要なことは、目的とする物質生産に関わる“鍵となる”反応を同定することである。その解析方法としては、これまで多くの手法が開発されてきたが、その中にメタボロームを基本とした代謝流束解析（フラックス解析、フラクソーム）がある。これは各代謝反応を定量化する方法であり、有用菌株育種に向けた強力なツールになると考えられる。各代謝経路上には図1に示すように、可逆反応やTCAサイクルのようにループ回路になっているなど多くの複雑な反応が存在する。複雑な代謝経路のフラックスを知るためには、¹³C 標識された基質を代謝

せ、ガスクロマトグラフ-質量分析（GC-MS）や核磁気共鳴（NMR）を用いて細胞内の¹³Cをトレースする必要がある。取得された情報をもっともよく説明する代謝フラックスをコンピュータ計算により解析することが可能となる¹⁾。

しかし、精密なフラックス解析結果を得るには達成すべき2つの課題が挙げられる。それは1) 取得データの実験誤差がフラックス解析結果にどれほど影響を与えるのか？ 2) 使用したデータによるフラックス解析結果をどのようにして検証するのか？ということである。これらの課題に対して、しばしば数学的・統計学的手法が用いられてきたが²⁾、本論文では、シミュレーションの手法を使いながらフラックス解析結果の精度を視覚的に評価できる方法を開発することで、GC-MS分析データを用いた精密なフラックス解析方法を確立した。コリネ型細菌（*C. glutamicum* および *C. efficiens*）の増殖期におけるフラックス解析を対象とし、GC-MSデータの測定誤差によって、どの程度フラックスが変化するかを調べ、解析結果の精度を調べた。さらにGC-MSデータのみを用いて決定されたフラックスをGC-MSとは独立のNMR分析データを用いて検証した。以上より、両菌株間の培養挙動の違いを代謝フラックスという観点から議論することができた。また今回、GC-MSデータに基づいて決定したフラックスが、解析には使用していないNMRデータと矛盾がないかを検証したことによって、コリネ型細菌においても大腸菌³⁾と同様にグリシンとセリン間のC1代謝に活性があることが新たにわかった。

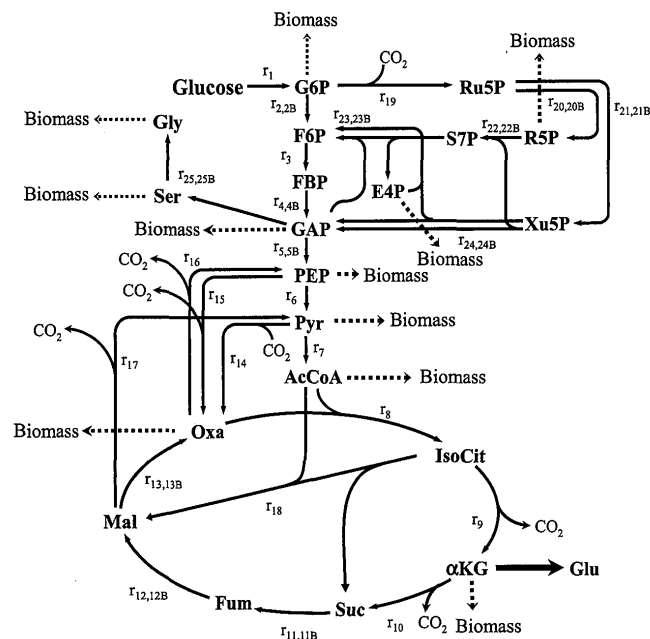


図1. コリネ型細菌の代謝モデル。可逆反応が存在する経路については r_{2B} , r_{4B} のように 'B' を付けて表示した。

1) Yang, C. et al.: *Metab. Eng.*, **4**, 202 (2002).

2) Klapa, M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **270**, 3525 (2003).

3) Fischer, E. and Sauer, U.: *Eur. J. Biochem.*, **270**, 880 (2003).