

東京大学大学院新領域創成科学研究科
情報生命科学専攻

平成 19 年度
修士論文

大腸菌の表現型情報に基づいた代謝解析

2008 年 3 月提出
指導教員 有田 正規 准教授

学籍番号 66963
松浦 麻子

目次

第1章 序論	…1
1-1 システムとしての生命への理解と本研究の目的	…1
1-2 表現型による網羅的な代謝解析の基盤整備と多変量解析	…4
1-2-1 Keio Collection	
1-2-2 Phenotype MicroArrays	
1-2-3 主成分分析	
1-2-4 自己組織化マップ	
第2章 表現型情報の抽出とその全体への解析	…13
2-1 概要	…13
2-2 先行研究	…15
2-3 文献データとの照合	…16
2-4 解析に用いたデータセット	…17
2-4-1 野生株	
2-4-2 変異株	
2-4-3 Phenotype MicroArrays	
2-5 データセットからの表現型情報抽出	…18
2-5-1 オリジナルデータから得られる情報	
2-5-2 データのマトリクス化	
2-5-3 オリジナルデータのスムージング	
2-5-4 表現型情報の抽出	
2-5-5 回帰直線算出における補正	
2-5-6 解析に用いる培地条件の選択と閾値の設定	
2-5-7 データ抽出の成長性と成長曲線の立ち上がり時刻の設定	
2-5-8 相関係数によるデータの再現性評価	
2-6 表現型情報全体への統計解析	…28
2-6-1 表現型情報全体の平均と分布	
2-6-2 表現型情報の実験株総当たりの相関係数とその分布	
第3章 データの詳細な解析	…30
3-1 概要	…30
3-2 解析の対象としたデータと解析手法	…31
3-2-1 表現型情報の値を0にする変異株及び培地条件	
3-2-2 相関係数の分布に見られた2つのコブ	
3-2-3 相関係数の分布の正規化	
3-2-4 自己組織化マップによるクラスタリング	
3-3 解析結果	…33
3-3-1 表現型情報の値を0にする変異株と培地条件	
3-3-2 相関係数の分布に見られた2つのコブ	
3-3-3 相関係数の分布の正規化	
3-3-4 自己組織化マップによるクラスタリング解析	
3-3-4-1 培地選択	
3-3-4-2 クラスタリング結果	

第4章	考察	…49
4-1	概要	…49
4-2	表現型情報が大きく変わる8つの変異株	…50
4-2-1	lpdA 欠失株	
4-2-2	aceE 欠失株、aceF 欠失株	
4-2-3	purH 欠失株、pyrF 欠失株	
4-2-4	atpF 欠失株、atpH 欠失株	
4-2-5	crp 欠失株	
4-3	野生株より増殖する培地を多く持つ変異株群による遺伝子機能予測	…54
4-4	菌体が増殖できない培地条件の割合で決まる14つの変異株	…58
4-4-1	metR 欠失株	
4-4-2	thrA 欠失株	
4-4-3	fbp 欠失株	
4-4-4	hns 欠失株	
4-4-5	gltA 欠失株	
4-4-6	sucA 欠失株	
4-5	菌体が増殖できない培地条件の特徴	…63
4-6	まとめ	…63
第5章	結論	…64
	謝辞	…65
	参考文献	…66
	別表	…69

第1章 序論

1-1 システムとしての生命への理解と本研究の目的

近年、ゲノムプロジェクト推進により、膨大な量のゲノム配列情報が蓄積されつつある。しかし、それに対しゲノムが司っている細胞全体がどのようなシステムとして活動しているのかに関しては未知であることが多い。中でも、生命活動の根幹をなす代謝システムを解析することは、生命システムを理解する上で非常に重要である。しかしながら、代謝システムには未だ明らかになっていない部分が無数に存在し、また既知の部分にも多くの missing enzyme が存在する。このため、代謝システムは、全体の解明・理解からは程遠い状態であり、その解析を行うことが強く必要とされている。

代謝をシステムとして理解するためには、代謝システム全体の挙動の最終的なアウトプットである表現型を解析する必要がある。例えば、表現型を支配する遺伝子にアイソザイムが存在することや、1つの表現型に対し複数の遺伝子が関与していることは、表現型を解析して初めて確認できることである。したがって、表現型解析にはこれまでに確認できなかったアイソザイムの存在、オペロン構造の存在、遺伝子間の繋がりなどの新たな知見の示唆が期待できる。また、こうしてゲノムと表現型を繋ぐことで、これまでトランスクリプトーム、プロテオームによって築かれてきた DNA からタンパク質までの流れを図 1-1 のように表現型まで到達させることができ、生物を完全に理解するための多面的なアプローチが可能となる。

表現型解析を行うためには、網羅的に表現型情報を取得する必要がある。近年の代謝ネットワークデータベースの充実と並行して、ごく最近、網羅的な遺伝子欠失株コレクションや、多数の条件における表現型情報を得るための技術が相次いで開発され、代謝ネットワークを表現型から解析するための基盤が整ってきた。また、取得された膨大な量のデータを解析する手法として、様々な多変量解析の手法が存在している。

そこで本研究では、変異株における遺伝子の生物学的な役割を考察し、機能未知遺伝子の機能予測を行い、代謝システムの解明の一端を担うことを目的とし、図 1-2 に示したような表現型解析を行う。単一遺伝子欠失株コレクションである Keio Collection から代謝系酵素遺伝子を中心に

選択した約 100 株の変異株及び野生株に対し、表現型情報を取得するための技術である Phenotype MicroArrays を適用し、1 つの変異株あたり約 2000 の培地条件において網羅的に取得した表現型データを用いる。この表現型データから、解析の指標とする表現型情報を抽出し、その表現型情報に対し、相関解析、自己組織化マップによるクラスター解析といった統計解析を行う。これらの結果から、ゲノム情報と表現型情報とを繋げ、代謝システムへの理解を進める。

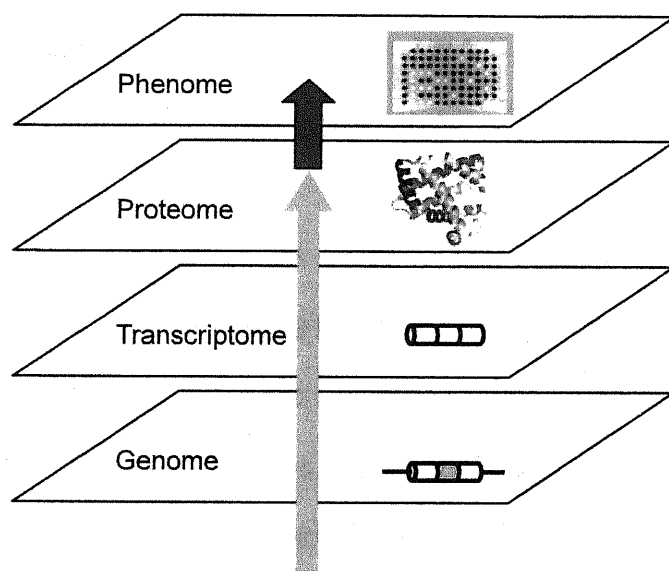


図 1-1 ゲノムから表現型までの情報の流れ

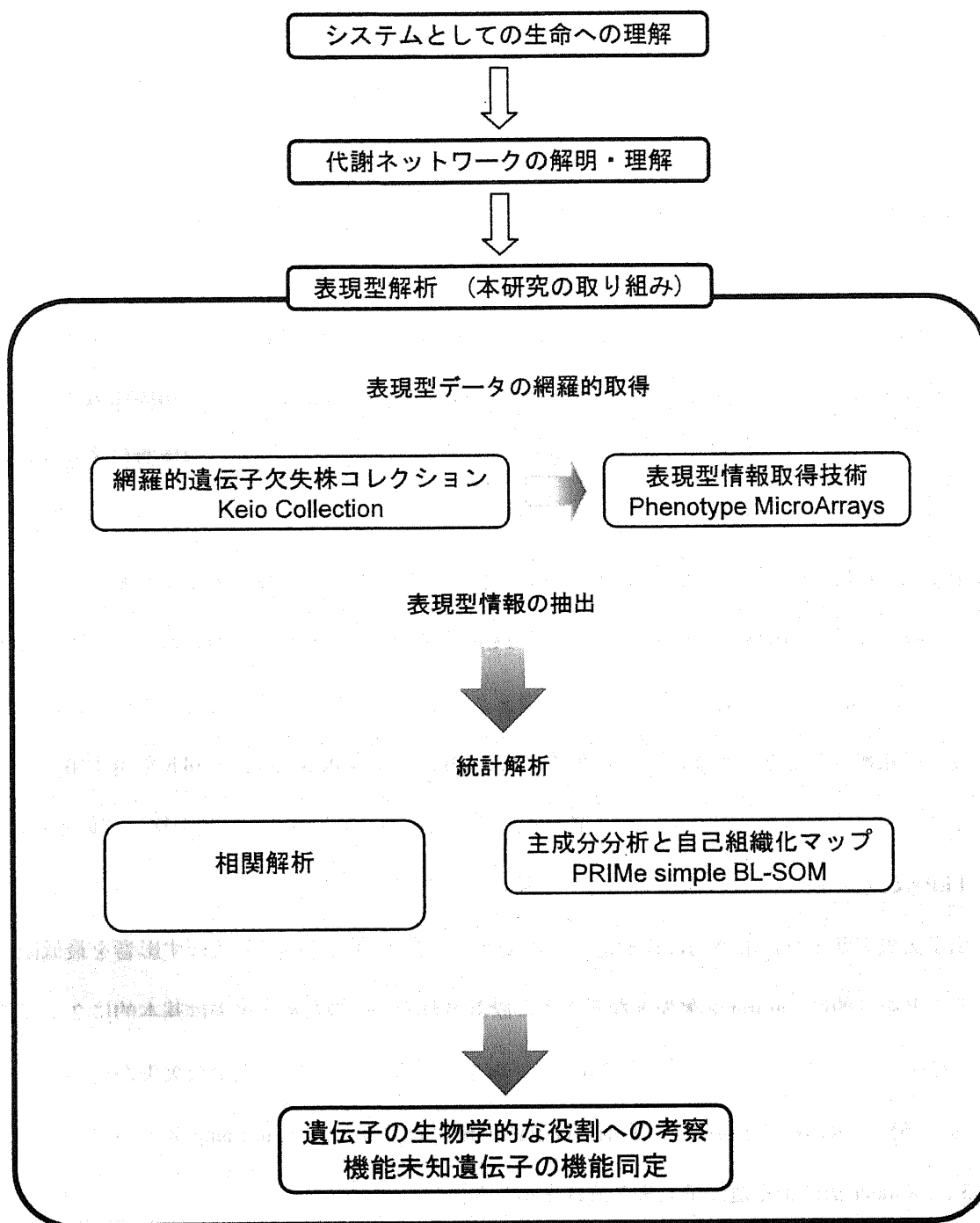


図 1-2 本研究の流れ

1-2 表現型による網羅的な代謝解析の基盤整備と多変量解析

ここでは本研究で用いた、網羅的遺伝子欠失株コレクション Keio Collection、表現型情報取得のシステム Phenotype MicroArrays、主成分分析法、自己組織化マップの1つである BL-SOM について述べる。

1-2-1 Keio Collection

Keio Collection (BAH. 2006) は大腸菌 K-12 株 BW25113 の 3985 の非必須遺伝子を網羅的に欠失させた単一遺伝子欠失株のセットである。

欠失株分離には Wanner らの開発した方法(以下、Wanner 法)を用いた(DW. 2000)。Wanner 法では入ファージの Red recombination 系を利用し、直鎖 DNA でかつ 40nt 程度の短い相同領域での相同組み換え反応が効率よく行われるよう工夫されている。この手法は、(1)薬剤耐性遺伝子を含む相同組み換え DNA を PCR で調整、(2)相同組み換えする DNA 配列をプライマーに付加、(3)Red recombinase の遺伝子を持つプラスミドを入れた菌株に対して Electroporation 法で PCR 産物を形質転換、(4)ゲノム上の目的領域の相同組み換えを PCR で確認、という流れで行われる。この方法の利点は PCR によって相同組換えさせる DNA 領域を簡単に調整でき、しかも特定の位置に性格に高い効率で組換えることが可能なことにある。また、2kb ほどの PCR 産物で 10kb を越す領域を組換えることも可能であり、組み込んだ薬剤耐性遺伝子はその両側に FRT 配列を持っているため、後に FLP recombinase によって欠失させることも可能である。

遺伝子欠失デザインは最終的に標的遺伝子の変異が下流の遺伝子発現に及ぼす影響を最低限に抑えることを目的に、in frame 欠失となるように設計された。そのため、欠失は基本的に 2 番目のアミノ酸をコードするコドンから C 末側 6 アミノ酸を残す形で、その間の完全な欠失が行われた。最終的に、酵母 FRT 配列を利用して薬剤耐性遺伝子を除去することで、in frame 欠失が完成する。

図 1-3 に Wanner 法による遺伝子欠失の流れを示した。

Baba らは前述の手法で、大腸菌 K-12 株の全予測遺伝子 4288 遺伝子の単一遺伝子欠失株を作製した。その作製の過程で変異株を見つけることで、303 の必須遺伝子、3985 の非必須遺伝子の存在を確認した。この 3985 の非必須遺伝子を網羅的に欠失させたセットを Keio Collection として公

開した。この非必須遺伝子は、うち 3912 遺伝子はアノテーションをつけられており、73 遺伝子は未だアノテーションをつけられていなかった。さらに、アノテーションされている 3912 遺伝子は、機能が同定されている 2157 遺伝子と機能未知とされている 1755 遺伝子に分けることができた。図 1-4 に大腸菌 K-12 株の ORF の分類について示した。

Keio Collection は公開されて以来、大腸菌の運動性をゲノムレベルでの解析や(ISH, 2007)、オペロンの機能解析(KMA 2007)に用いられており、今後も大腸菌のポストゲノム研究、システムバイオロジーの基盤として大いに活用されていくと考える。

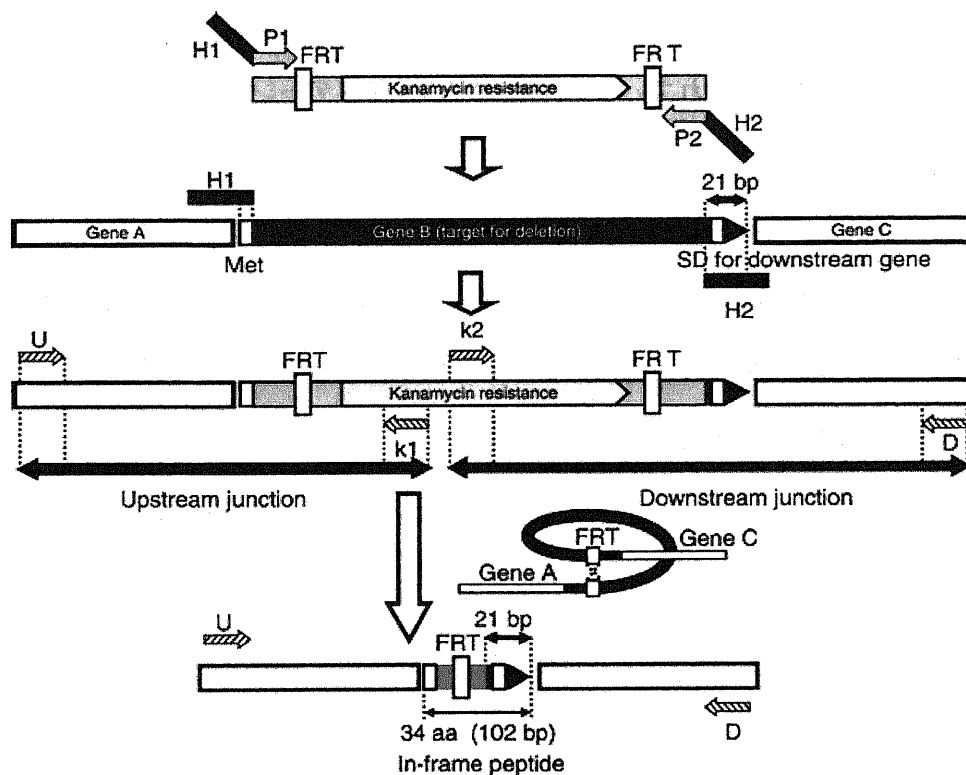


図 1-3 Wanner 法による遺伝子欠失の流れ
(BAH 2006 より転載)

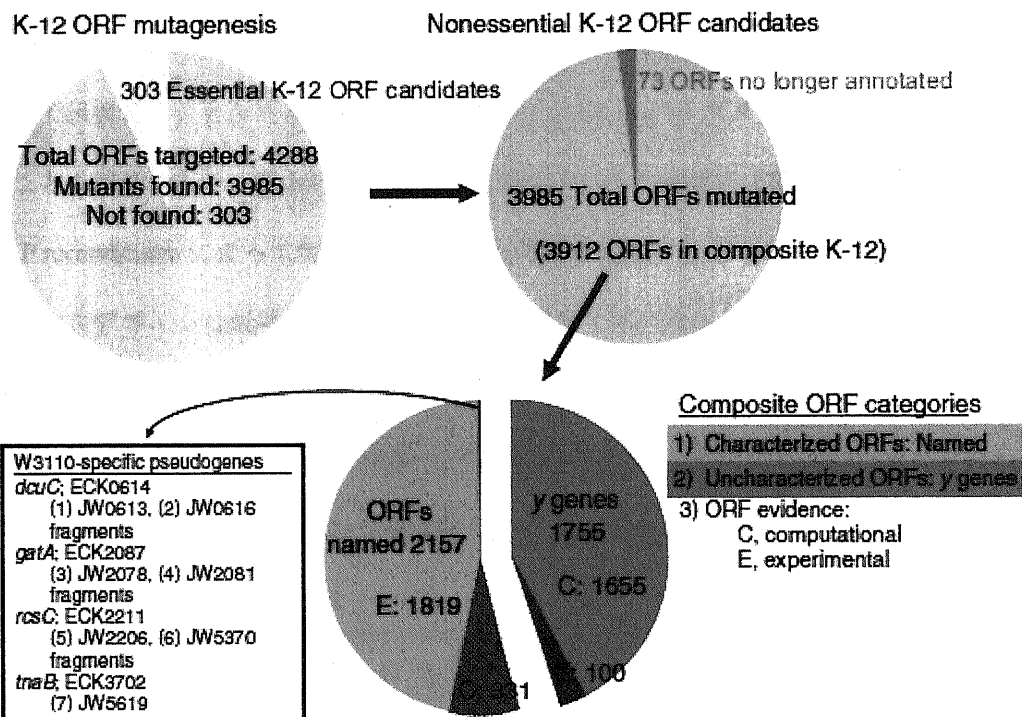


図 1-4 大腸菌 K-12 株における ORF の分類
(BAH 2006)より転載)

1-2-2 Phenotype MicroArrays

Phenotype MicroArrays は、アメリカの Biolog 社によって細胞の増殖過程を定量的に評価するシステムとして開発された。このシステムは一度に数千の条件について細胞の増殖過程を観測することを可能とした、培養と観測をハイスループットに行う統合解析システムである。この全体の流れを図 1-5 に示す。

Phenotype MicroArrays システムでは一連の操作を一枚当たり 96 つのウェルを持つマイクロタイタープレート上で行っている(図 1-5 左)。それらの培地条件はプレートごとに大きく分類されており、さらにその中で組成の設定が行われており、各ウェルにはそれぞれ違った組成の培地が設計されている。Biolog 社はこのようなプレートを 40 枚、約 4000 種の培地条件を提供している。

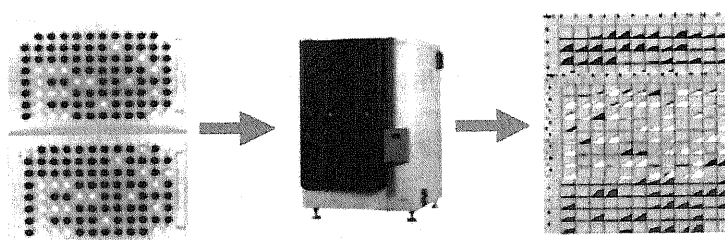


図 1-5 Phenotype MicroArrays における一連の流れ
(<http://www.biolog.com/pmTechDesOver.html> より転載)

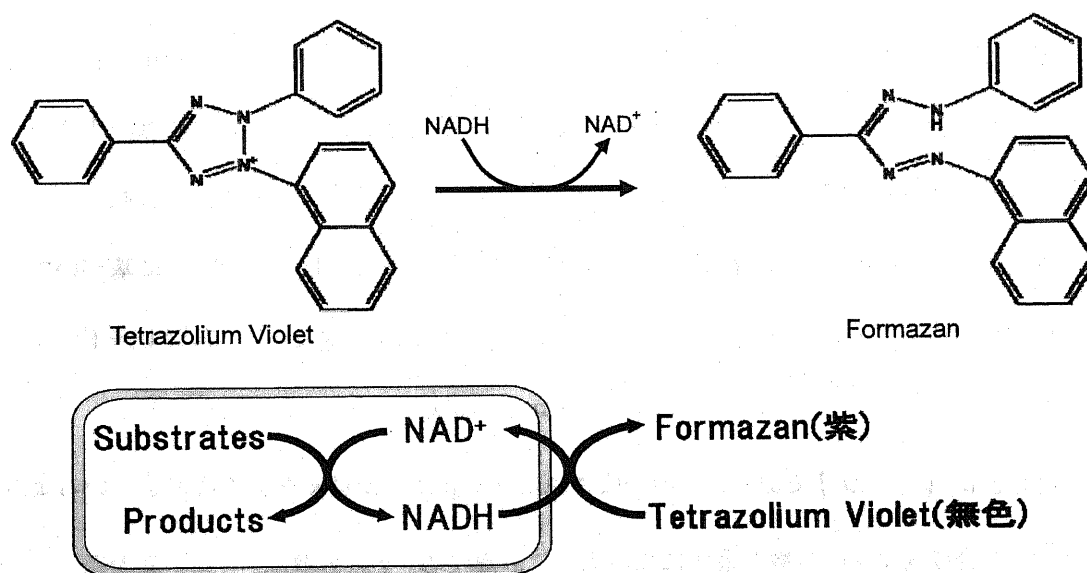


図 1-6 テトラゾリウムと NADH による酸化還元反応

Phenotype MicroArrays システムでは、細胞の増殖過程を観測するために、テトラゾリウムの呈色を利用している。テトラゾリウムは還元されるとホルマザンに変化し紫色に呈色する化合物で、このシステムでは菌体の細胞内における NADH 酸化還元反応に連動し還元され呈色する。この反応を図 1-6 に示す。NADH の産生は呼吸と連動していることを利用して、産生された NADH の還元力でテトラゾリウムを還元させその呈色の様子を観測することで、細胞における呼吸量の測定、ひいては細胞の増殖過程を測定することができる。この測定は Biolog 社独自のシステムである、OmniLog システムによって行われる。OmniLog システムは、プレートを 15 分毎に観測し、呈色の様子を 24 時間以上測定することが可能である。以上のことから、Phenotype MicroArrays システムでは 24 時間以上の培養実験を一度に数千種の条件において行い、定量的に観測することを可能にしている。

近年ではこの Phenotype MicroArray を用いた研究として、大腸菌を用いた二成分制御系の解析 (ZLB 2003) や、6 つの株の表現型解析からの他の株の表現型の予測 (BGP 2001) などが行われてきた。

1-2-3 主成分分析 (Principal Component Analysis (PCA))

主成分分析は、多数の変量を持つデータの変動をなるべく少数の総合的指標によって代表させる多変量解析の手法である。マイクロアレイ遺伝子発現データの解析などに利用されることが多く、多変量データを二次元や三次元の成分に近似して単純化し、遺伝子間の関係の生物学的な解釈を視覚的に容易にするために有効な手法とされている。以下に手法の概要を示す。

例えばいま、 n 個体の p 変量観測値が与えられているとする。これらのデータに基づいて、総合的な指標を求めるために、変量 x_1, \dots, x_p に対して任意の係数 a_1, \dots, a_p を用いて式 (i) を作る。

$$z = a_1 x_1 + \dots + a_p x_p = a'x \quad \cdots (i)$$

このとき、 $a = (a_1, \dots, a_p)$ である。この合成された z が p 個の変量 x をよく代表しているようにするために、合成変量 z の分散が最大になるように計算する。 z の分散は

$$V(z) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (z_i - \bar{z})^2 = \sum_{j=1}^p \sum_{k=1}^p s_{jk} a_j a_k = a' S a \quad \cdots (ii)$$

で表せる。ここで、 s_{jk} は x_j と x_k との共分散、 S は s_{jk} を (j,k) 要素に持つ分散共分散行列である。式

(i)の z は p 次元空間の中で原点 O からある OZ 方向に z 軸を取ることを意味するが、そのときの z 座標のスケールを x_1, \dots, x_p 軸と同じにとることにすれば、係数 a_1, \dots, a_p はそれぞれ直線 OZ の方向余弦になり、

$$a'a = a_1^2 + \dots + a_p^2 = 1 \cdots (\text{iii})$$

を満たす。したがって、式(iii)の制約のもとで式(ii)を最大化することになる。このような制限付きの最大化問題はラグランジュ定数変化法を用い、

$$F(a, \lambda) = a'Sa - \lambda(a'a - 1) \cdots (\text{iv})$$

と変形される。式(iv)を a の各要素で偏微分して0とおけば、

$$\frac{1}{2} \frac{\partial F}{\partial a} = (S - \lambda I)a = 0 \cdots (\text{v})$$

のような行列 S の固有値問題を得る。 S は対称行列であり、 p 個の実数で負ではない固有値 $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_p$ を持つ。各固有値に対する固有ベクトルを a_1, a_2, \dots, a_p とすれば、式(v)より

$$Sa_j = \lambda_j a_j$$

両辺に a'_j を左からかけると、

$$a'_j Sa_j = \lambda_j a'_j a_j = \lambda_j$$

となり、 λ はちょうど $z_j = a'_j x$ の分散に等しくなることがわかる。

したがって、分散を最大にする合成変量は、最大固有値 λ_1 に対応する固有ベクトル $a_1 = (a_{11}, \dots, a_{p1})'$ の要素を係数として、

$$z_1 = a'_1 x = a_{11}x_1 + \dots + a_{p1}x_p \cdots (\text{vi})$$

のように作ることができる。これを第1主成分と呼ぶ。同様に、第2主成分は

$$z_2 = a'_2 x = a_{12}x_1 + \dots + a_{p2}x_p \cdots (\text{vii})$$

と表せる。このようにして導出した m 個の主成分によって表される個体を m 次元空間に位置づけることで、個体間の関係を見ることができる。

代謝の分野ではデータセットを視覚化したり、有意な情報を抽出したりする手法として非常にポピュラーなツールになっている(SGS 2004)。例えば、*Arabidopsis thaliana*の代謝物に関する ^1H

NMR の解析に用いたり(WHL 2003)、ジャガイモの RNA と代謝物のプロファイリングを同定するために用いたり(ULK 2003)している。また、1-2-4 で述べる PRIME の simple BL-SOM でも用いられている。

1-2-4 自己組織化マップ(Self Organizing Map (SOM))

1-2-4-1 自己組織化マップの概要

自己組織化マップは Kohonen らによって開発された(KK 1996)教師なし学習によるクラスタリングの手法の 1 つであり、与えられた多次元のデータ群の 1 つ 1 つを二次元平面など低い次元に対応させることができる手法である。平面上では類似したデータ同士が近くに配置されるため、

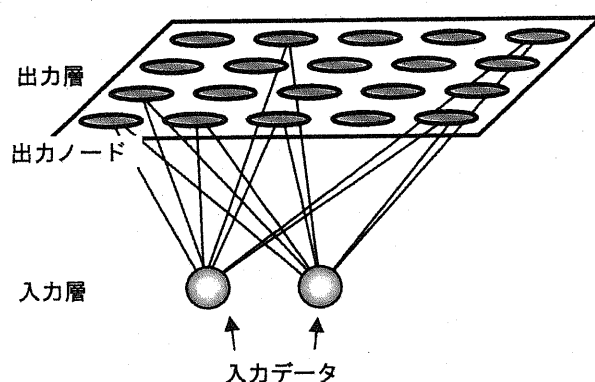


図 自己組織化マップの構造

データ間の類似関係が感覚的にわかりやすくなる。以下に大まかなアルゴリズムを示した。

自己組織化マップでは図に示したように、出力層と呼ばれる二次元平面上のノード、入力層と呼ばれるデータ入力用のノード、そしてすべての出力層のノードとすべての入力層のノードをつなぐ結線を定義する。また、入力 i と出力 j の間の結線に重みベクトル w_{ij} を割り当てる。入力と出力の距離をすべて計算し、最小距離となるノードを特定し、その近傍の重みベクトルを更新し、入力ベクトルに近づける。これを繰り返すことで、似た性質を持ったノード(似た重みベクトルを持ったノード)が出力層でクラスターを形成する(斎藤 2005)。

自己組織化マップは様々な研究に用いられている。例えば、分子モデリング(HHE 2001)、コンビナトリアル化学による ^1H NMR スペクトルの解析(KDG 2002)、MRI の特長のビジュアル化(BMB

2003)などに用いられている。ゲノム研究でも遺伝子発現データのクラスタリングや(MPB 2002)、
 バクテリアの Codon usage の分布の解析(KKA 2001)に用いられている。特に金谷らによる Codon
 Usage の解析に用いられている SOM は以下に説明する simple BL-SOM を用いている。

1-2-4-2 simple BL-SOM

本研究では、理化学研究所から PRIME (Platform for RIKEN Metabolomics)として提供されてい
 るアプリケーション simple BL-SOM を用い、Batch Learning SOM(BL-SOM)を作成した。BL-SOM
 は学習順序に依存する性質をなくした自己組織化マップである。以下にアルゴリズムを示した。

1) PCA による重みベクトルの初期値の設定

s 番目の M 次元の入力ベクトル x_s を式(viii)のように表す。

$$x_s = (x_{s1}, x_{s2}, \dots, x_{sM}) \cdots (\text{viii})$$

したがって、データセットは式(9)のようなマトリクスで表せる。

$$X = \begin{pmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & \cdots & x_{1M} \\ x_{21} & x_{22} & & & x_{2M} \\ \vdots & \vdots & \ddots & & \vdots \\ \vdots & \vdots & & \ddots & \vdots \\ x_{N1} & x_{N2} & \cdots & \cdots & x_{NM} \end{pmatrix} \cdots (\text{ix})$$

ここで N は入力ベクトルの数とする。

また、二次元の格子点を i, j ($1 \leq i \leq I$, $1 \leq j \leq J$)とする。二次元の格子点(i, j)上に
 M 次元の重みベクトル $w_{ij}=(w_{ij1}, w_{ij2}, \dots, w_{ijM})$ を置く。この初期重みベクトル w_{ij} は入
 力ベクトル x_i の平均 x_{av} を基準とした 2 つの主成分軸によって決定する。入力ベクトル
 x_i に対して得られた主成分第 1 及び第 2 ベクトルを b_1 及び b_2 とする。これらの二つの
 軸に対する入力ベクトルの標準偏差を σ_1 および σ_2 とする。このとき、 w_{ij} は式(10)に
 よって定義される。

$$w_{ij} = x_{av} + \frac{5\sigma_1}{I} \left[b_1 \left(i - \frac{I}{2} \right) + b_2 \left(j - \frac{J}{2} \right) \right] \cdots (\text{x})$$

ここで、 $J = I\sigma_1 / \sigma_2$ とする。

2) 重みベクトルの更新

すべての入力ベクトル x_k を最小のユークリッド距離を持つ重みベクトル w_{ij} に分類する。次に次式によって、重みベクトル w_{ij} を更新する。

$$w_{ij}^{(new)} = w_{ij}^{(old)} + \alpha(t) \left(\frac{\sum_{x_k \in S_{ij}} x_k}{N_{ij}} - w_{ij}^{old} \right) \dots (xi)$$

ここで、 S_{ij} は $i - \beta(t) \leq i' \leq i + \beta(t)$ かつ $j - \beta(t) \leq j' \leq j + \beta(t)$ の条件を満たす格子点 i', j' に分類された入力ベクトル x_k の集合、 N_{ij} は S_{ij} の要素数である。また、 $\alpha(t)$ は学習係数、 $\beta(t)$ は近傍を決定する数である。 α と β は式(xii)で計算される。

$$\alpha(t) = \text{MAX} \left\{ 0.01, \alpha(1) \left(1 - \frac{t}{T} \right) \right\} \dots (xii)$$

$$\beta(t) = \text{MAX} \{ 0, \beta(1) - t \}$$

T は学習回数、 $\alpha(1)$ 、 $\beta(1)$ は初期値である。

学習は式(xiii)によって定義する二乗誤差で評価する。

$$Q(t) = \sum_{k=1}^N \{ x_k - w_{i',j'} \}^2 \dots (xiii)$$

ここで、 i', j' は x_k が分類された格子点である。 $(1 \leq k \leq N)$

3) 入力ベクトルを重みベクトルによって分類する

各入力ベクトルとすべての重みベクトルとの距離を求め、最小の距離を持つ重みベクトルと対応する格子点に分類する。

第2章 表現型情報の抽出とその全体への解析

2-1 概要

本研究では、Keio Collection と Phenotype MicroArrays によって得た、細胞の NADH 産生に関する経時変化データから表現型情報を抽出し、それらを解析した。この NADH 産生に関する経時変化データからは、表現型情報としていくつかの指標を得ることができるが、本研究では細胞の対数増殖期における NADH 産生速度を表現型情報とした。

本章ではオリジナルデータから細胞の対数増殖期における NADH 産生速度の抽出方法、及び抽出した値の再現性について述べる。また、抽出した表現型情報の値全体がどのような分布を持つのか、実験株同士はどのような相関が持つのか統計解析を行う。図 2-1 に本章の流れを示す。

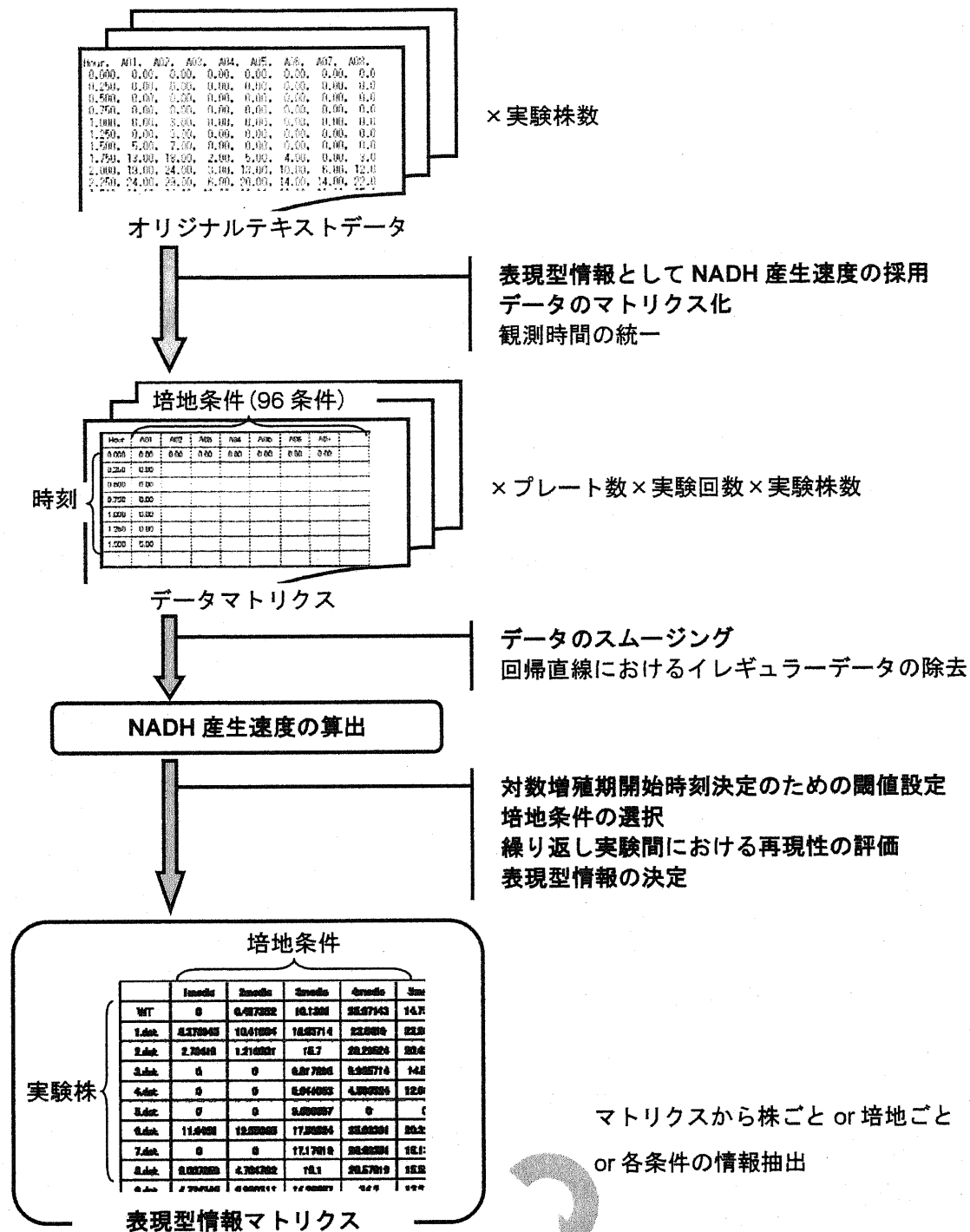


図 2-1 本章で行った解析の流れ

2-2 先行研究

河原央明氏は本研究と同じデータセットを用い、表現型情報に基づいた遺伝子ネットワークの解析を行った(河原央明 2006)。河原氏は表現型情報として細胞の対数増殖期の NADH 産生速度をデータセットから抽出し、その情報を用いて相関係数による実験株間の比較解析を行った。実験株総当たりで求めた相関係数、野生株と変異株間で求めた相関係数、そして代謝マップ上のパスウェイにおいて隣接している変異株間の相関係数をそれぞれ算出し分布を調べた結果、野生株と変異株との相関係数は、高い値で高頻度に存在していることを示した。また、既知情報として変異株の遺伝子欠失の影響が大きいとされている遺伝子(crr, lpdA, pfkA, tktB)についてはそれに沿った結果を示した。

その結果から野生株と多くの変異株は高い相関を有しており、逆に野生株と差のある培地条件の特定が容易であるとし、ここで野生株との統計的差を持つ可能性を示す t 値を以下の式によって算出した。

$$\begin{aligned} \frac{(y_{ij} - a)}{b} &= y'_{ij} \\ s &= \sqrt{\frac{S_{y'y'} - S_{y'}^2}{n-2}} \quad \dots(a) \\ t_j &= \frac{y_j - x_j}{s \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_j - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}} \end{aligned}$$

このとき、 y_{ij} は NADH 産生速度を示す直線 $y=a+bx$ の y 値であり、各ウェルで算出された直線をすべて、 $y=x$ に補正した。s は野生株と変異株間での相関係数の値の中で、最も野生株との相関が高かった株を選定し、このときの NADH 産生速度を示す直線の y 値の標準偏差を示す。これらの値から各ウェルのデータが野生株と統計的差を持つ可能性を示す値として t 値を計算した。そして、この後、各ウェルのデータが野生株と統計的差を持たない確率 p 値に変換を行った。さらに p 値の統計的差を両側検定 5%棄却域で判別し、値を 0 または 1 で表現したバイナリ形式にデータを変換した。そのバイナリデータを用い、株間の相関係数を求め、その相関係数を用いてグラフィッククラスタリングによるクラスター解析を行った。その結果、解糖系、TCA 回路、ペントースリ

ン酸経路の3つの代謝経路の流れを一定のクラスごとに分類することができた。

以上の結果から河原氏は、表現型情報から代謝ネットワークにおける遺伝子間の繋がり、遺伝子欠失の表現型への影響を再現することに成功した。しかし、機能未知遺伝子の機能予測、実験条件間の比較、実験条件を特定した解析は行っていなかった。

2-3 文献データとの照合

まず、今までの文献(NCI 1996)に記載されている変異株と培地条件との関係を調査した。文献に記載されている情報とその情報と Phenotype MicroArrays システムの結果が一致しているか否かの例を表 2-1 に示した。

表 2-1 文献情報と Phenotype MicroArrays システムによる結果の整合性の例

関連遺伝子	文献情報	Phenotype MicroArrays システムの結果との合致
pgm	pgm mutants are impaired on galactose...	×
glk	glk mutants grow almost normally on glucose	○
tktB	tktB mutants are aromatic auxotrophs also impaired on pentoses and deficient in heptose	△
pfkA	pfkA mutants are impaired in their growth on substances catabolized via fructose-6-P	×
pgi	Mutants grow slowly on glucose using the pentose-P pathway	×
fbp	fbp mutants fail to grow on substances such as glycerol, succinate and acetate	×

表 2-1 に示したとおり、一致するものもあれば、一致しないものもあった。また、文献に記載されている変異株と培地条件との関係の情報は解糖系の遺伝子欠失株に関して、糖類を中心とした炭水化物を含む培地といった非常に限られた組み合わせしか情報が存在せず、Phenotype MicroArrays のように、網羅的に数千もの培地条件で細胞の増殖に対する遺伝子の欠失の影響を確認することはできていなかった。本研究では、Phenotype MicroArrays システムを用いることで、今まで確認できなかった環境下における変異株の細胞の増殖に関する情報を得て、新たな知見を得ることが期待できる。

2-4 解析に用いたデータセット

本研究では、大腸菌の野生株、変異株及び細胞の入っていないコントロールデータに対して Phenotype MicroArrays システムを適用し取得した NADH 産生に関する経時変化データをデータセットとして用いた。

2-4-1 野生株

野生株は Keio Collection の親株である BW25113 を用いた。BW25113 は大腸菌 K-12 株から図 2-2 に示した手法(BAH 2006)で作製された。本研究ではこの野生株 6 株を対象とした。

2-4-2 変異株

変異株は Keio Collection の中から代謝系酵素遺伝子を中心に選択した 106 株を対象とした。これらの JW 番号、遺伝子名、機能及び所属代謝経路を別表 1 において示した。

2-4-3 Phenotype MicroArrays

Phenotype MicroArray (以下 PM)システムでは、グラム陰性菌用に用意されたポジティブ及びネガティブコントロールを含む 1920 条件についてデータを取得した。培地条件の詳細については、その分類、各組成を別表 2 において示した。

計測は各培地において原則 2 回ずつ行われていたため、本研究では 113 株×1920 培地条件×2 回分、約 400000 の NADH 産生に関する経時変化データを用い解析を行った。

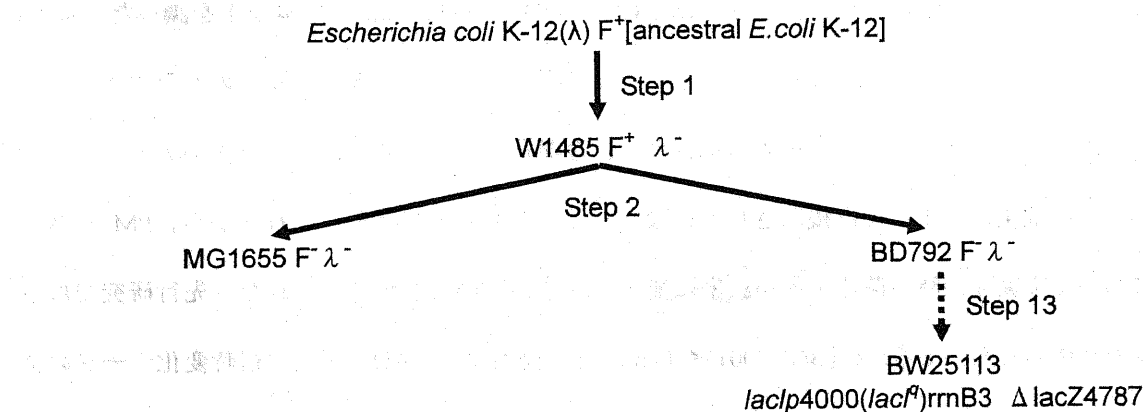


図 2-2 BW25113 の作製の流れ
(BAH 2006 改)

2-5 データセットからの表現型情報抽出

2-5-1 オリジナルデータから得られる情報

PM システムから得られるオリジナルデータは、観測時間 t_i ($1 \leq i \leq m$) と、培地条件 j ($1 \leq j \leq n$) に対応した観測強度 x_{ij} である。これを培地条件ごとに横軸を観測時間、縦軸を観測強度としてプロットすると、菌株のその培地条件における NADH 産生量の経時変化、すなわち菌株の成長曲線を示すことができる。この NADH 産生に関する経時変化データからは、図 2-3 に示したように遅滞期の長さ、対数増殖期における NADH 産生速度、定常期の菌体量といった情報を取得することができる。

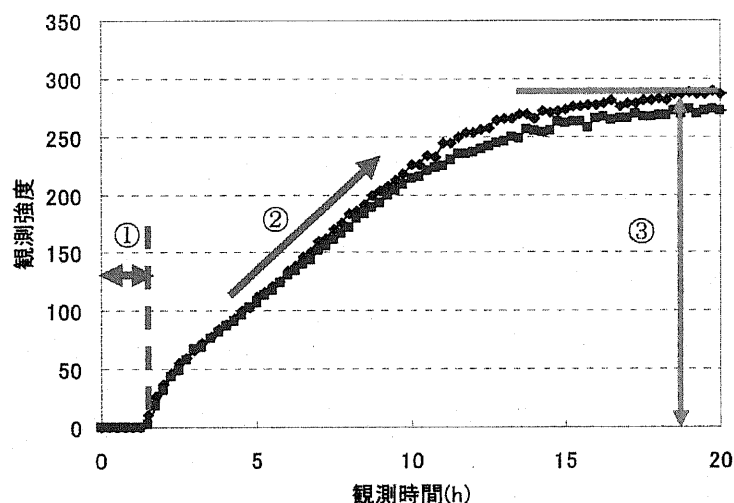


図 2-3 PM システムから得られるオリジナルデータの二次元プロットと
3つの抽出可能な情報

例：野生株 D-Alanine 添加培地によるデータ

①遅滞期の長さ ②NADH 産生速度 ③定常期の観測強度

そこでまず、野生株 6 株のデータの全培地条件での成長曲線の二次元プロットを調べた。図 2-4 に例をいくつか示した。ここで示したように、繰り返し実験間で遅滞期の長さのバラツキが大きいことが確認できた。また定常期の観測強度は、遅滞期の長さと同様にバラツキが大きいことのほかに、培地条件によっては観測されていなかったことも確認できた。これらから、PM システムにおいて実験開始時の菌体密度が厳密に揃えられていないことが考えられた。先行研究ではウェルの呈色の有無による比較(BGP 2001)や Omnilog が提供する NADH 産生の経時変化データのグラフをそのまま重ねて比較(BGP 2001、ZLB 2003)がなされたが、これらの手法はデータが定量化されておらず比較が明確でない。そこで、本研究では表現型情報として、対数増殖期における

NADH 産生速度、すなわち成長曲線の傾きを用いることとした。

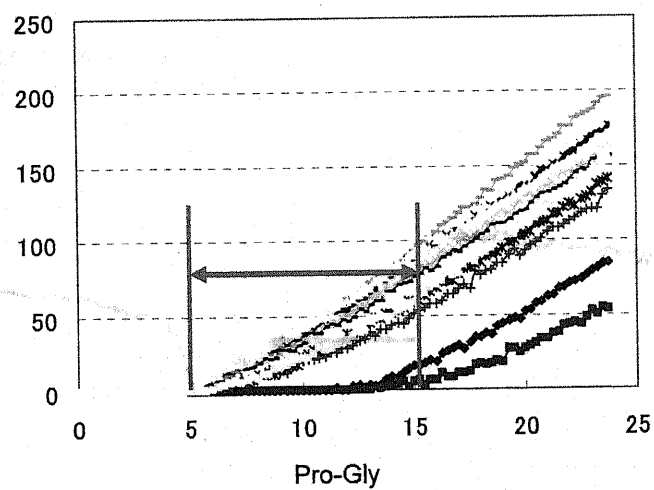
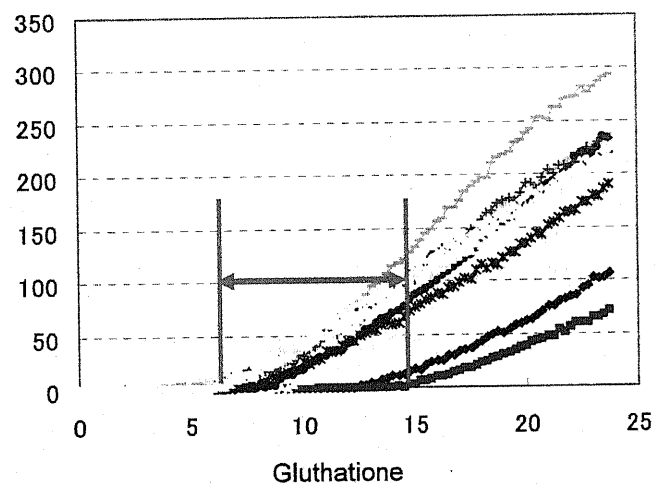
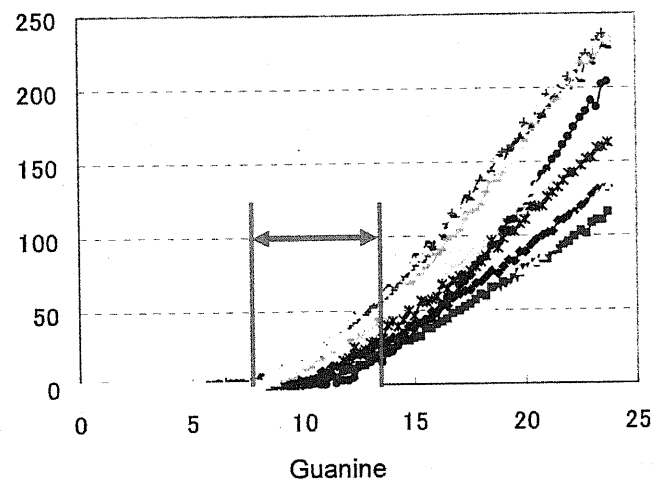


図 2-4 遅滞期の長さと定常期の観測強度の違いの例
横軸：観測時間(h) 縦軸：観測強度

2-5-2 データのマトリクス化

オリジナルデータは株ごとにテキストデータとして取得することができる。本研究では図 2-1 で示したようにまず、プレートごとに経時変化データを、時刻×培地条件で表すマトリクスとした。このマトリクスは各株においてプレートの枚数×実験回数分できる。

PM システムでは、15 分毎に観測を行っている。データのマトリクス化の際、すべてのオリジナルデータを確認したところ、観測時間の最長は 47.50 時間(191 観測ポイント)、最短は 23.25 時間(94 観測ポイント)であった。そこで、本研究では解析に用いるオリジナルデータは最短観測時間である 23.25 時間までとしてマトリクス化した。このマトリクスを用いてさらにデータのスムージング、対数増殖気における NADH 産生速度の抽出を行った。

2-5-3 オリジナルデータのスムージング

オリジナルデータをそのまま用いると標準誤差を多く含んでいるため、まず移動平均を用いてオリジナルデータをスムージングした。移動平均は、時系列データを平滑化する手法であり、時系列データの持つ基本傾向を得るための手法である。

時刻 t_i に関する t_{i-k} から t_{i+k} の時間、培地条件 j における移動平均 a_{ij} は

$$a_{ij} = \frac{1}{2k+1} \sum_{l=i-k}^{i+k} x_{lj} \cdots (1)$$

で算出することができる。本研究では観測時間 1 時間を意味する $k=2.5$ 、観測点 5 ポイント区間での移動平均を求めることでデータのスムージングを行い、対数増殖期の NADH 産生速度を抽出するための統計量とした。

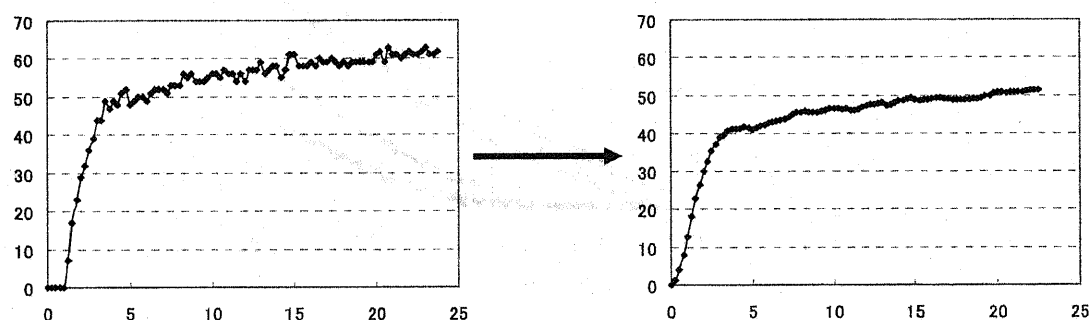


図 2-5 オリジナルデータのスムージング
横軸：観測時間(h) 縦軸：観測強度

2-5-4 対数増殖期における NADH 産生速度の抽出

2-5-3 でスムージングしたデータを用いて対数増殖期における NADH 産生速度を抽出した。具体的な方法を以下に示す。

NADH 産生に関する経時変化データのプロットに対しある一定時間の範囲における回帰直線を曲線全体に対して可能な限り算出し、その傾き群の中で最大の値を取るデータを対数増殖期における NADH 産生速度とした。図 2-6 にイメージ図を示した。観測時刻 t_i 、培地条件 j における観測強度を a_{ij} 、時刻 t と観測強度 a の共分散を S_{ta} 、時刻 t の重分散を S_{tt} とする。また、ある一定時間を示す観測ポイント数を f とした。このとき観測時刻 t_i 、培地条件 j 、実験株 l における回帰直線の傾き u_{jil} は式(2)で求められる。

$$u_{jil} = \frac{S_{ta}}{S_{tt}} = \frac{\sum_{g=i}^{i+f} (t_g - \bar{t})(a_{gj} - \bar{a}_j)}{\sum_{g=i}^{i+f} (t_g - \bar{t})^2} = \frac{\sum_{g=i}^{i+f} t_g a_{gj} - \frac{(\sum_{g=i}^{i+f} t_g \cdot \sum_{g=i}^{i+f} a_{gj})}{f}}{\sum_{g=i}^{i+f} t_g^2 - \frac{(\sum_{g=i}^{i+f} t_g)^2}{f}} \cdots (2)$$

ここで $1 \leq i \leq (m-f-2k)$ 、 $1 \leq j \leq n$ 、 $1 \leq l \leq e$ 、 m はデータの最大観測ポイント数、 n は培地条件数、 e は実験株数である。対数増殖期における NADH 産生速度を b_{jl} とすると、 b_{jl} は u_{jil} 群の最大値であり、式(3)で表せる。

$$b_{jl} = \text{Max}\{u_{1jl}, u_{2jl}, \dots, u_{(m-f-2k)jl}\} \cdots (3)$$

この b_{jl} はウェルごとに算出されるので、1 つの株の表現型情報は式(4)のように培地条件数次元のベクトルデータとして表すことができる。

$$b_l = (b_{1l}, b_{2l}, \dots, b_{nl}) \cdots (4)$$

以下、このベクトルを速度ベクトルと表す。

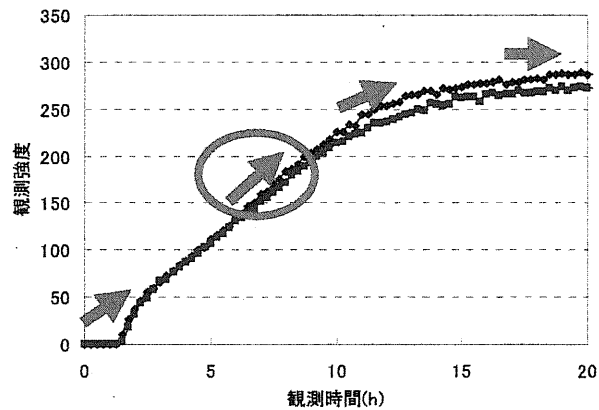


図 2-6 成長曲線の傾きの抽出方法
丸で囲んだ矢印を成長曲線の傾きとして採用する

2-5-5 回帰直線算出における補正

対数増殖期における NADH の産生速度はオリジナルデータを式(1)によってスムージングしたのち、式(2)によって算出するが、スムージングされた後でも異常に高かったり低かったりするイレギュラーな値が見受けられる場合がある。そのイレギュラーな値を取り除き信頼性向上をさせるため、回帰直線を求めるときのデータの直線性を、 u_{ijl} を求めるときに使用した f 個の観測強度と時刻の相関係数を求めることで評価した。具体的には次の方法で評価した。

f 個の観測ポイントから 1 つずつ観測ポイントを除いた $f-1$ 個の観測ポイントによる相関係数を算出し、その中で最大の相関係数を持つ観測ポイントの組み合わせを抽出する。すなわち、 f 回相関係数を算出し、最大の相関係数を持つ観測ポイントの組み合わせを見つける。その組み合わせの相関係数が 0.95 以上であったとき、そのデータ群から回帰直線の傾きを算出し、 u_{jkl} とした。もし相関係数が 0.95 を超える組み合わせがなかった場合、 $u_{jkl}=0$ とした。

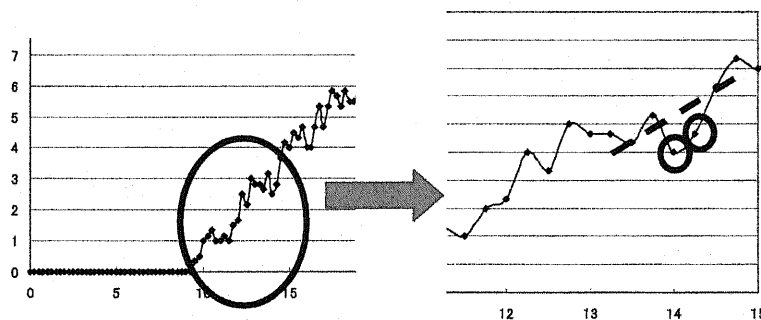


図 2-6 回帰直線算出における補正

例：nhaR 欠失株 N-Acetyl-D-Glucosamine 添加培地のスムージング後のプロット

横軸：時間 縦軸：スムージング後の観測強度

点線のような回帰直線を引くために実線の丸のような値を除く

2-5-6 解析に用いる培地条件の選択と閾値の設定

細胞の増殖に関わらず呈色する培地条件は本研究の解析に対して悪影響を及ぼす。そこで細胞の入っていないコントロールデータ(以下 コントロールデータ)を用い、菌体の成長とは無関係な呈色を見せる培地条件を特定し、本研究における解析から除外した。

コントロールデータは細胞を加えずに PM システムによってデータを取得したものであることから、コントロールデータ中で高い観測強度を示す培地条件は解析に対して悪影響を及ぼす可能性が高いと考えた。図 2-7 にコントロールデータにおける最大観測強度の分布とその累積存在率を示した。

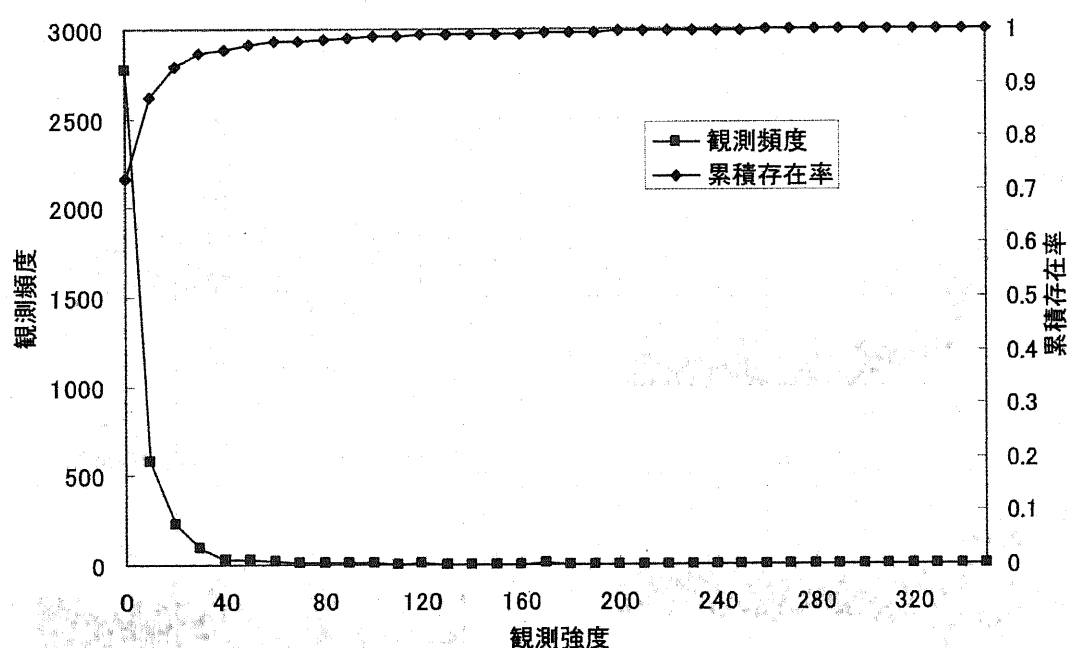


図 2-7 コントロールデータにおける最大観測強度の分布とその累積存在率

累積存在率が 95%を超える観測強度は 30、96%を超える観測強度は 40 である。これらの値より小さい値の観測強度は菌体がなくても観測されてしまうことがわかった。本研究ではこの結果から閾値を 40 とした。閾値以内に収まっている培地条件の個数は全 3840 データ中 3668 データで、これは全体の約 95%に相当した。閾値よりも高い強度を示すデータは 172 個 98 培地条件であった。これらの培地条件ではどのような傾向が見られるのか実際にオリジナルデータをプロットしたものを確認したところ、観測データは細胞の増殖とは関係がないように考えられた。このデータ例を図 2-8 に示した。

これらの結果から、実験の初期段階から高い観測強度が観測され、細胞の増殖とは関係のないと考えられる培地条件は解析の対象からは除外することとした。結果、1882の培地条件を採用し、以下の解析に用いた。また、観測強度が閾値を超えるまでは細胞は増殖していない、とした。

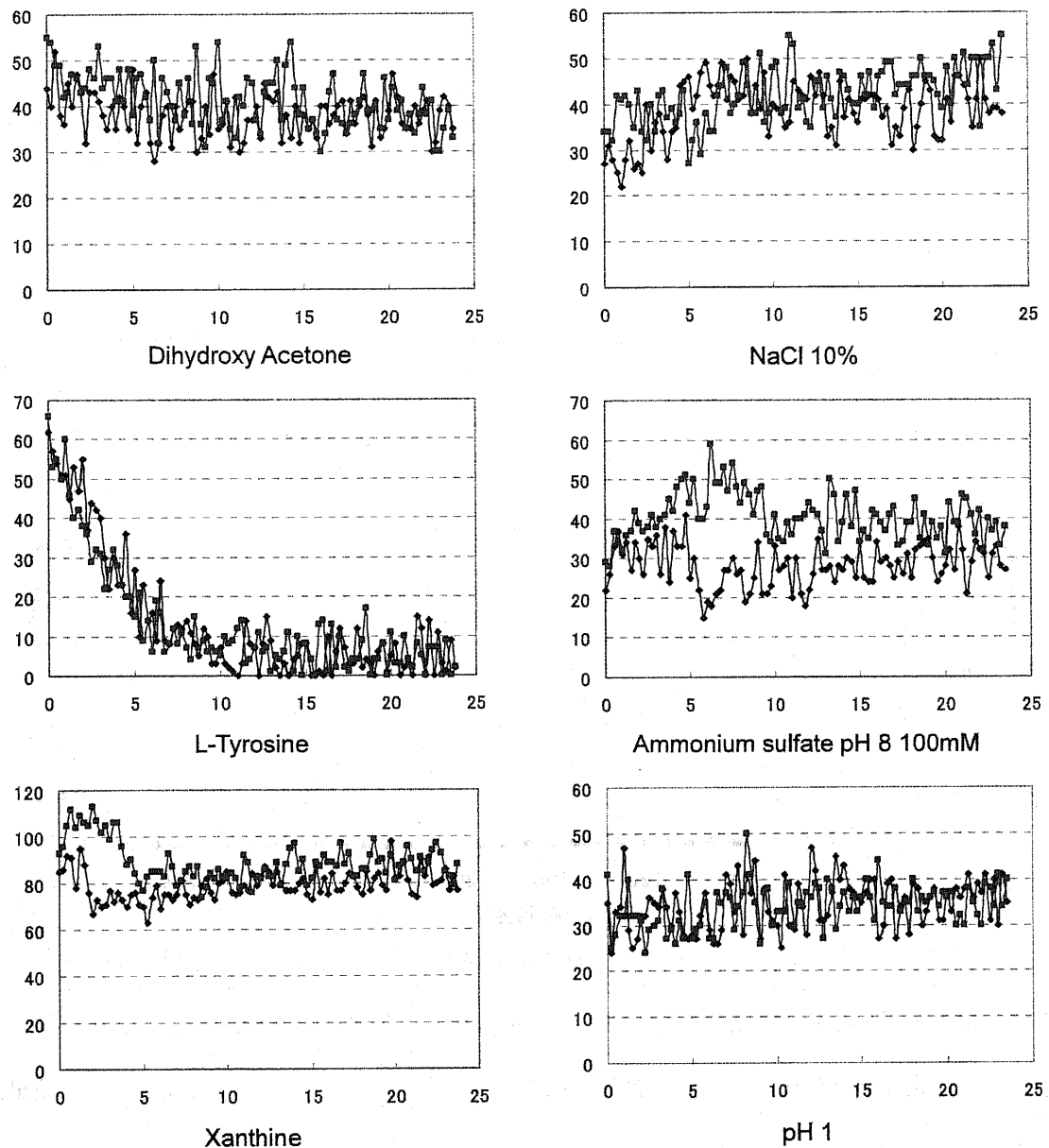


図 2-8 NC データにおける高観測強度のデータ例
横軸：観測時間(h) 縦軸：観測強度

2-5-7 データ抽出の正当性と成長曲線の立ち上がり時刻の設定

2-5-4 で述べた手法で抽出した値が、対数増殖期における NADH 産生速度であるかどうかを確認した。例としてグルコースを添加した培地での *pgi* 変異株の実験による成長曲線とその傾きの抽出開始時刻を図 2-9 に示した。

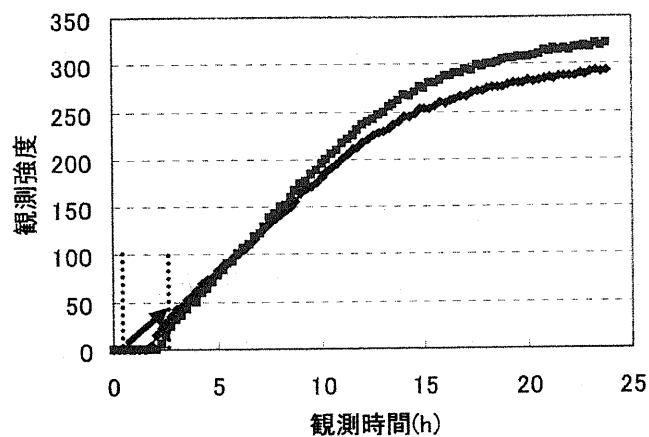


表 傾きと補正前の抽出時刻

傾き	抽出時刻(h)
25.54	0.75
25.98	1.25

図 2-9 補正を加える前の傾き抽出開始時刻
例： *pgi* 変異株 グルコース添加培地

この補正を加えたのちのグルコースを添加した培地での *pgi* 変異株の実験による成長曲線とその傾きの抽出開始時刻を図 2-10 に示した。

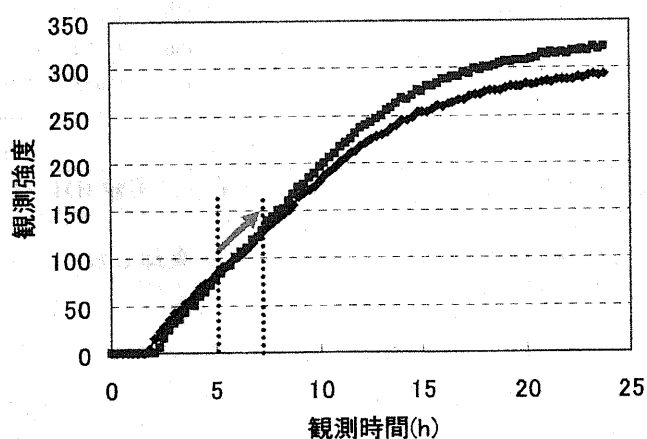


表 傾きと補正後の抽出時刻

傾き	抽出時刻(h)
21.22	5.25
24.83	5.50

図 2-10 補正を加えた後の傾き抽出開始時刻
例： *pgi* 変異株 グルコース添加培地

この結果より、補正によって対数増殖期にあたる時刻から傾きを抽出できていることがわかった。したがってこれ以降の解析ではこの補正をかけて抽出した値を用いることにした。

2-5-8 相関係数による対数増殖期における NADH 産生速度の再現性評価

PM システムでは原則 2 回の繰り返し実験を行った。各株に原則 2 つずつここで同一株間において、繰り返し実験間における速度ベクトルの相関を式(5)にしたがって求めた。このとき算出された相関係数をもとにデータの再現性を評価した。

$$r_M = \frac{S_{b_i b_j}}{\sqrt{S_{b_i b_i} S_{b_j b_j}}} = \frac{\sum_{g=1}^{m-f-2k} (b_{ig} - \bar{b}_i)(b_{jg} - \bar{b}_j)}{\sqrt{\sum_{g=1}^{m-f-2k} (b_{ig} - \bar{b}_i)^2 \sum_{g=1}^{m-f-2k} (b_{jg} - \bar{b}_j)^2}} \dots (5)$$

①野生株データの再現性評価

本研究では野生株 6 株、実験回数 2 回の合計 12 個の野生株データが存在する。ここで、各実験において算出された速度ベクトル間の相関係数を算出した。以下に相関係数の表を示す。実験 ID は野生株－実験回数として示した。

表 2-1 野生株総当たりで求めた相関係数

実験 ID	1-1	1-2	2-1	2-2	3-1	3-2	4-1	4-2	5-1	5-2	6-1	6-2
1-1	1	0.818	0.76	0.756	0.728	0.728	0.745	0.755	0.734	0.745	0.75	0.756
1-2		1	0.88	0.902	0.875	0.876	0.897	0.903	0.884	0.898	0.897	0.904
2-1			1	0.921	0.901	0.9	0.896	0.908	0.907	0.911	0.911	0.912
2-2				1	0.932	0.924	0.925	0.925	0.93	0.93	0.939	0.938
3-1					1	0.934	0.927	0.912	0.932	0.932	0.938	0.918
3-2						1	0.915	0.905	0.921	0.914	0.926	0.907
4-1							1	0.934	0.943	0.936	0.942	0.926
4-2								1	0.94	0.939	0.942	0.936
5-1									1	0.956	0.951	0.939
5-2										1	0.958	0.954
6-1											1	0.957
6-2												1

表の網掛けのセルは相関係数が 0.9 未満のものである。この表からわかるように実験 ID1-1、1-2、つまり野生株 1 株において相関係数が低い値を示しているため、この株を棄却し残りの 5 株を用い解析に用いた。

②変異株データの再現性評価

本研究で用いた変異株 106 株に関しても、各株で繰り返し実験間の速度ベクトルの相関係数を算出し、ヒストグラムを図 2-11 に示した。その結果、約 97% の株において 0.9 以上の相関係数を示していた。したがって変異株の再現性は高い、と言えた。

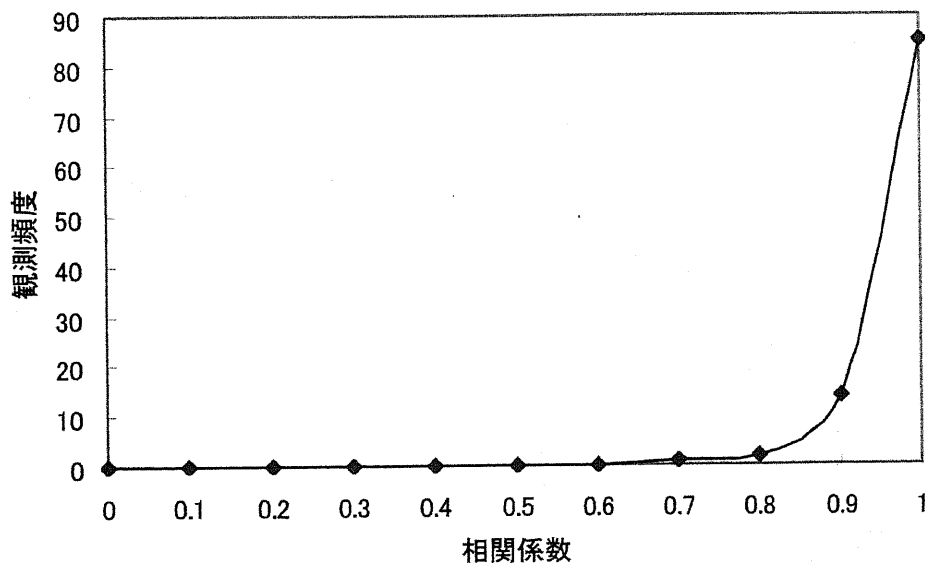


図 2-11 同一変異株における繰り返し実験間の相関係数のヒストグラム

これらの結果より、野生株 5 株と変異株 106 株においてそれぞれ繰り返し実験間の再現性は高いと言えた。そこで、各株において、繰り返し実験間の各培地条件における表現型情報の平均値を算出し、その値を各ウェルの表現型情報とし、以降の解析に用いることとした。このとき、野生株は 10 回の繰り返し実験が行われた、とした。

ここで、以降の解析で用いる値及び本論文で用いる用語をまとめる。

各株各培地条件において、2-5-4 で示した手法に対して、2-5-5、2-5-6、2-5-7 で示した補正を加えることで抽出された、対数増殖期における NADH 産生速度の繰り返し実験間の平均値を表現型情報とする。また、2-5-6 によって選択した 1822 の培地条件を用いる。これらの表現型情報は、各株で式(6)で示すようなベクトルで表し、それらを式(7)で示すようなマトリクスの形に整理して以降の解析に用いる。また、このベクトルを各株の表現型情報ベクトル、このマトリクスを表現型情報マトリクスと呼ぶ。

$$b_i = (b_{i1}, b_{i2}, \dots, b_{in}) \dots (6)$$

$$b_{ij} = \begin{pmatrix} b_{11} & b_{12} & \dots & \dots & \dots & \dots & b_{1n} \\ \vdots & & & & & & \vdots \\ \vdots & & \ddots & & & & \vdots \\ \vdots & & & \ddots & & & \vdots \\ b_{m1} & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & b_{mn} \end{pmatrix} \dots (7)$$

2-6 表現型情報全体への統計解析

2-6-1 表現型情報全体の平均と分布

2-5 で算出した各ウェルの表現型情報全体の分布を確認し、図 2-12 に示した。その結果より値が 0 を取るものが多いことがわかったため、0 を示すウェルを除いた分布を図 2-13 に示した。このとき横軸は表現型情報の値、縦軸は頻度とした。

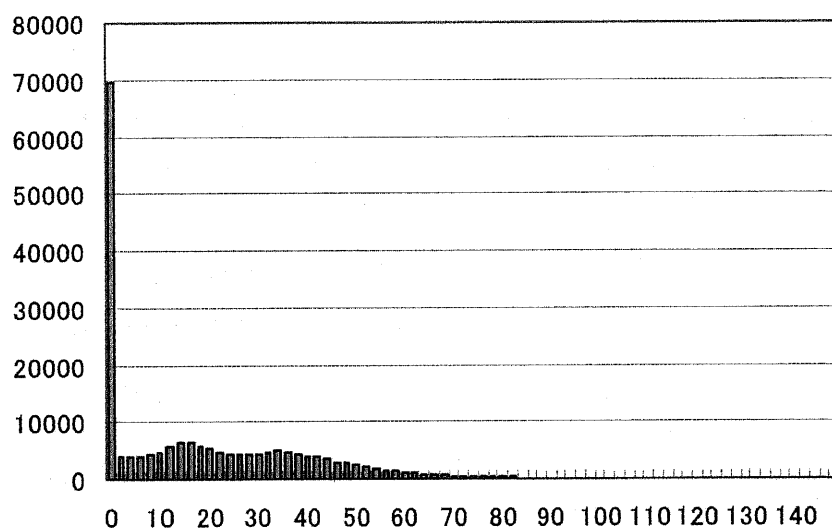


図 2-12 表現型情報全体の分布

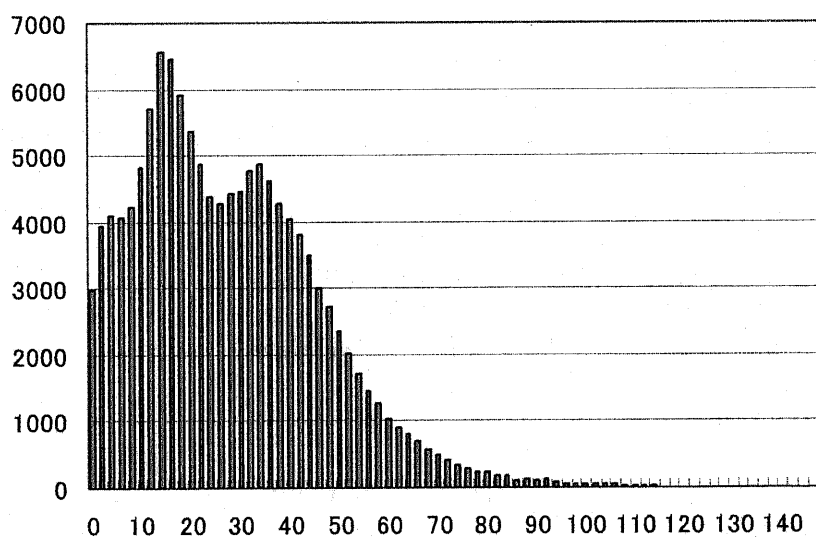


図 2-13 表現型情報全体から 0 を除いたときの分布

また、各実験株の表現型情報の平均を算出し、その分布を図 2-14 に示した。

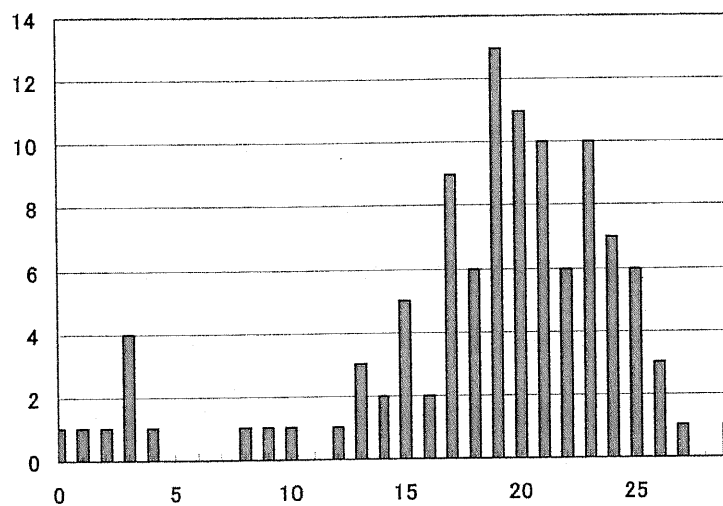


図 2-14 各実験株の表現型情報の平均値の分布
横軸：表現型情報の値 縦軸：頻度

表現型情報の分布には二峰性が見られたが、各実験株の表現型情報の平均値の分布には二峰性は見られなかった。

2-6-2 表現型情報の実験株総当たりの相関係数とその分布

野生株 + 変異株 106 株の計 107 株総当たりで表現型情報ベクトルの相関係数を算出した。この相関係数の分布を以下の図 2-15 に示した。

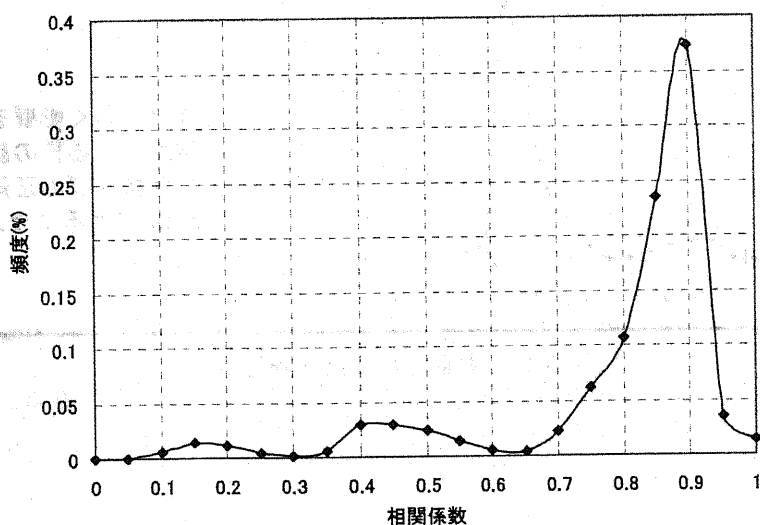


図 2-15 実験株総当たりの相関係数の分布

図 2-15 からわかるように、分布には小さな 2 つのコブと大きな 1 つの山が見られた。

第3章 データの詳細な解析

3-1 概要

第2章で表現型情報の抽出とその全体の解析を行った。本章では、その結果をさらに詳細に解析した。2-6-1より表現型情報の値の分布を確認したところ、非常に0を示すウェルが多いことがわかった。そこで、表現型情報を0にする特徴を持つ変異株及び培地条件がないか調べた。また、2-6-2より株総当たり相関係数の分布には2つの小さなコブと1つの大きなコブが見られた。このコブに強く影響を与えている株が存在しないか調べた。図3-1に本章で行った解析の概要を示した。

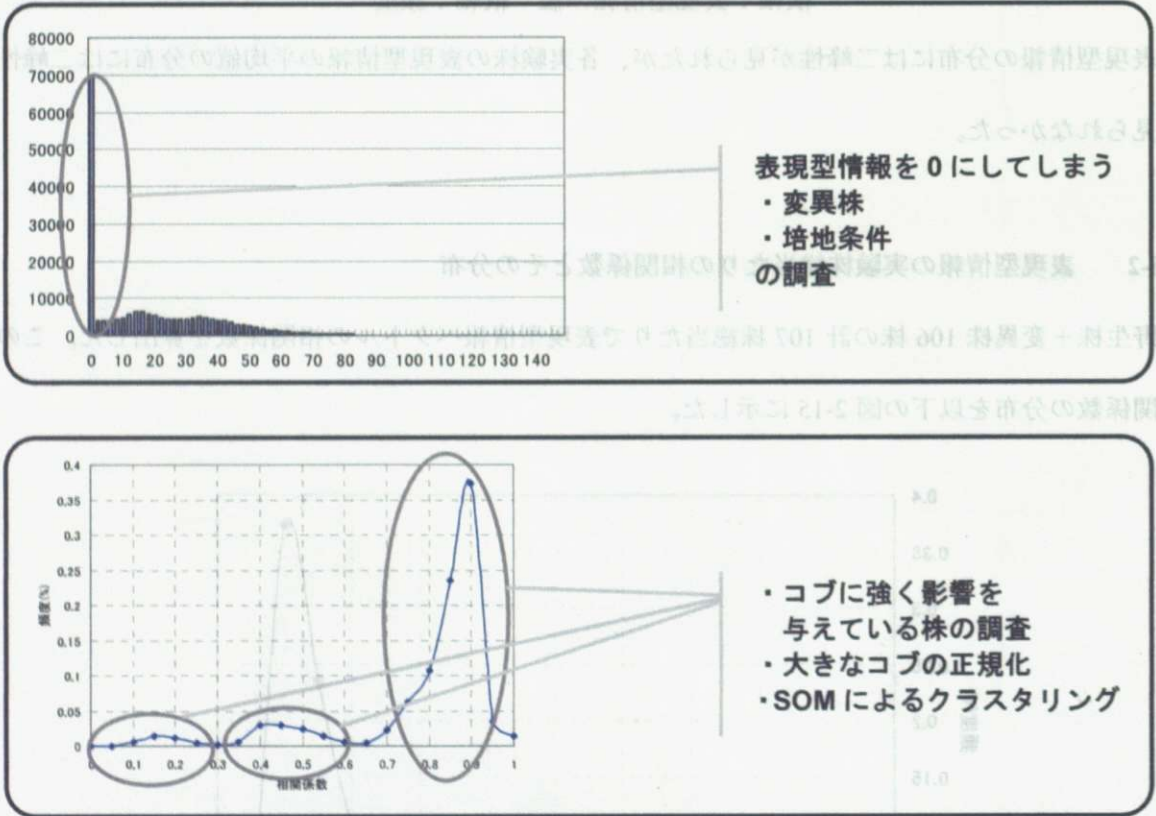


図3-1 本章で行った詳細解析

3-2 解析の対象としたデータと解析手法

3-2-1 表現型情報の値を 0 にする変異株及び培地条件

図 2-10 に示した表現型情報全体の分布によると、値が 0 であるウェルが非常に多かった。そこで、変異株ごと及び培地条件ごとに表現型情報の値が 0 となるウェルをいくつ持つかそれぞれ数え、特有の変異株、培地条件が存在しないか調べた。

3-2-2 相関係数の分布に見られた 2 つのコブ

2-5-7 で示した全実験株間総当たりで算出した相関係数の分布では、0.1~0.3、0.4~0.6 の範囲にそれぞれ小さなコブが観測された。そこで、このコブに強く影響を与えている株が存在しないかを調べた。0.1~0.3、0.4~0.6 の相関係数を作る実験株の組み合わせすべてを調べ、各実験株の出現回数を調べた。

3-2-3 相関係数の分布の正規化

3-1-1 では小さなコブ 2 つに注目したが、同様に 2-5-7 で示した相関係数の分布で見られた大きな山に注目した。まず、小さなコブ 2 つに強く影響を与えている株を除き正規化した。具体的には、小さなコブ 2 つに強く影響を与えている株を除いた残りの実験株の総当たりの相関係数の平均値、標準偏差を算出し、式(8)を用いて Z スコアを計算した。またその Z スコアの分布を確認した。その分布から、外れ値として抽出できる実験株が存在しないか確認した。

$$Z = \frac{X_i - \bar{X}}{\sigma} \dots (8)$$

3-2-4 自己組織化マップによるクラスタリング

相関係数による解析のほかに異なった手法を用いデータを解析することを試みた。本研究では、多くの培地条件を持つこと、またクラスター数が不明であることから PRIME のアプリケーションである simple BL-SOM によるクラスタリングを行った。

PRIME による simple BL-SOM では 1-2-4 で示したとおり PCA を初めに行うが、その際、計算時

間が $O(n^2)$ はかかるため、用いることができる条件の数はせいぜい 200 程度であった。そこで、1822 条件の中からいくつかの培地条件の組み合わせを作成し、その培地条件の組み合わせを用いてクラスタリングを行った。

3-3 解析結果

3-3-1 表現型情報の値を 0 にする変異株と培地条件

各株において、表現型情報が 0 になる培地条件はいくつあるのかカウントし、その割合を算出した。表 3-1 にその結果を割合が小さい順のランキングで示した。ほとんどの実験株が 20% から 35% の割合で表現型情報が 0 になる培地条件を持っていた。一方で、91 位以降の実験株では 45% 以上の割合を示し、他の実験株とは大きく割合を変化させていた。

また、101 以上の株で表現型情報が 0 となる培地条件について詳細に調べた。結果、1822 培地条件中、287 培地条件存在し、特に Plate10 までの 128 培地条件について注目して表 3-2 に示した。Peptide Nitrogen Sources のプレートでは特徴が顕著で、バリン、イソロイシン、ヒスチジン、ロイシンが影響を強く与えていることがわかった。また、128 の培地条件全体を見ても、バリン、イソロイシン、ヒスチジン、ロイシンが加えられている培地条件は 44 培地条件存在し、影響が強いことがわかった。

表 3-1 各株の傾きが 0 になる培地条件の割合とそのランキング

Rank	Gene	Rate	Rank	Gene	Rate	Rank	Gene	Rate
1	adhE	21.84	37	gip	28.21	73	cadA	31.06
2	pflA	22.01	38	nhaA	28.27	74	pfkA	31.12
3	ascB	22.45	39	proY	28.27	75	arcA	31.17
4	pflB	22.89	40	glvB	28.32	76	dhaL	31.34
5	tktB	23.00	41	cadC	28.32	77	aldH	31.39
6	ybdO	23.60	42	focB	28.32	78	sgaB	31.39
7	acyP	23.60	43	yabB	28.38	79	ppc	31.45
8	ybiC	23.77	44	nrdE	28.38	80	ackA	31.56
9	yglI	23.93	45	pck	28.54	81	pgm	31.67
10	tdcD	24.26	46	nank	28.59	82	nrdF	31.72
11	ybeF	24.48	47	adhC	28.65	83	glnQ	31.78
12	agp	24.97	48	glnB	28.65	84	speF	32.55
13	WT	25.03	49	nhaB	28.81	85	adhP	32.77
14	galM	25.52	50	acrD	28.81	86	zwf	33.10
15	ascF	25.63	51	pykF	28.92	87	aldH	33.21
16	fbaB	25.96	52	cycA	28.92	88	pgi	33.59
17	ptsG	26.29	53	glnK	28.98	89	yibO	35.29
18	gndC	26.67	54	frdC	29.31	90	sucC	36.17
19	phoE	26.67	55	gapC	29.36	91	icdA	44.13
20	yafC	26.78	56	speC	29.53	92	crr	45.01
21	yiaY	26.89	57	pheP	29.58	93	metL	48.24
22	kefC	27.28	58	IdcC	29.75	94	metR	49.73
23	aroP	27.33	59	frdB	29.80	95	thrA	51.92
24	nhaR	27.55	60	acs	29.97	96	fbp	53.07
25	sgaE	27.55	61	focA	30.02	97	hns	53.90
26	yfhT	27.72	62	frdD	30.02	98	gltA	54.94
27	bglA	27.77	63	glpX	30.08	99	sucA	56.81
28	kefB	27.77	64	tpiA	30.19	100	atpH	62.13
29	talB	27.88	65	frdA	30.30	101	atpF	65.26
30	pfkB	27.94	66	yabN	30.46	102	purH	72.61
31	talA	27.94	67	pflB	30.46	103	aceF	77.50
32	lrp	27.99	68	bglB	30.57	104	aceE	79.64
33	glvG	28.05	69	malX	30.74	105	crp	83.92
34	glvC	28.05	70	celF	30.74	106	pyrF	85.07
35	gpmG	28.05	71	pykA	30.90	107	lpdA	94.95
36	glk	28.16	72	ygaA	30.90			

表 3-2-1 成長曲線の傾きがほとんどの株で 0 となる培地条件

Carbon Sources	Nitrogen Sources	Phophorus and Sulfur Sources	Nutrient Supplements
計 20 個	計 33 個	計 0 個	計 1 個
D-Aspartic Acid	Nitrate		L-Valine
D-Arabitol	Urea		
2-Deoxy-D-Ribose	Bluret		
L-Erithritol	L-Histidine		
3-Methyl Glucose	L-Isoleucine		
alpha-Methyl-D-Mannoside	L-Leucine		
N-Acetyl-D-Glucosaminitol	L-Valine		
2-Hydroxy Benzoic acid	D-Aspartic Acid		
4-Hydroxy Benzoic acid	D-Glutamic Acid		
beta-Hydroxy Butyric acid	D-Lysine		
gamma-Hydroxy Butyric acid	N-Acetyl-D,L-Glutamic Acid		
alpha-Keto-Valeric Acid	L-Pyroglutamic Acid		
Itaconic acid	HydroxylAmine		
Quinic acid	MethylAmine		
Sebacid acid	N-AmylAmine		
Sorbic Acid	N-ButylAmine		
D-Tartaric acid	Ethylamine		
L-Homoserine	Ethanolamine		
L-Isoleucine	Ethylenediamine		
L-Leucine	Histamine		
	beta-Phenylethyl-amine		
	Tyramine		
	Formamine		
	D,L-Lactamide		
	D-Galactosamine		
	Thymine		
	Thymidine		
	Uracil		
	Uridine		
	Inosine		

表 3-2-2 成長曲線の傾きがほとんどの株で 0 となる培地条件

Peptide Nitrogen Sources	Osmolytes	pH
計 48 個	計 4 個	計 22 個
His-Tyr	Urea 5%	pH 6
His-Val	Urea 6%	pH 4.5 + L-Arginine
Ile-His	Urea 7%	pH 4.5 + L-Asparagine
Ile-Ile	sodium Benzoate pH5.2 20 mM	pH 4.5 + L-Glutamic Acid
Ile-Tyr		pH 4.5 + L-Methionine
Ile-Val		pH 4.5 + L-Phenylalanine
Leu-Ile		pH 4.5 + L-Serine
Negative control		pH 4.5 + L-Threonine
Leu-Val		pH 4.5 + L-Tryptophane
Lys-Val		pH 4.5 + L-Tyrosine
Met-Val		pH 4.5 + Hydroxy-L-Proline
Phe-Phe		pH 4.5 + beta-Hydroxy Glutamate
Pro-Hyp		pH 4.5 + D,L-Diamine pimelic acid
Ser-Val		pH 9.5 + L-Arginine
Val-Arg		pH 9.5 + Anthranilic acid
Val-Asp		pH 9.5 + L-Norleucine
Val-His		pH 9.5 + Putrescine
Val-Ile		pH 9.5 + Histamine
Val-Leu		X-alpha-D-Glucoside
Val-Tyr		X-alpha-D-Glucoronide
Val-Val		X-alpha-D-Mannoside
Negative control		
Phe-Val		
Pro-Val		
Trp-Val		
Tyr-Ile		
Tyr-Val		
Val-Glu		
Val-Lys		
Val-Met		
Val-Phe		
beta-Ala-Gly		
beta-Ala-His		
beta-Ala-Phe		
D-Ala-D-Ala		
D-Ala-Leu		
D-Leu-D-Leu		
D-Leu-Gly		
D-Leu-Tyr		
gamma-D-Glu-Gly		
Gly-D-Asp		
Gly-D-Thr		
Gly-D-Val		
Leu-beta-Ala		
Leu-D-Leu		
Phe-beta-Ala		
Val-Tyr-Val		
Leu-Leu-Leu		

3-3-2 相関係数の分布に見られた2つのコブ

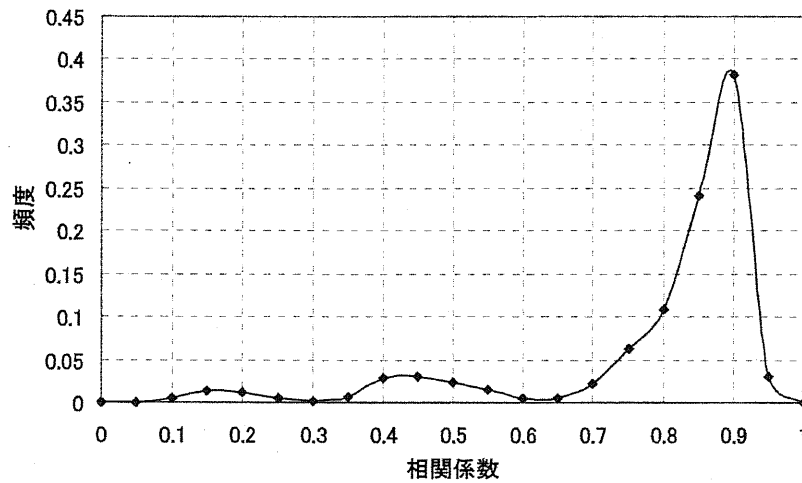


図 3-2 実験株総当たりの相関係数の分布

相関係数の分布に見られた2つのコブは、相関係数 0.1～0.3 の範囲と 0.4～0.6 の範囲に見られた。以下に 0.4～0.6 の範囲に見られたコブに出現する実験株の出現回数と割合を表 3-3 に示した。

表 3-3 から、遺伝子 *aceE*、*aceF*、*pyrF*、*purH*、*atpH*、*atpF* を欠失させた変異株がこのコブに対し大きな影響を与えていることがわかった。

同様に表 3-4 に相関係数 0.1～0.6 の範囲にあるコブへの全株の出現回数とその割合を示した。表 3-4 から遺伝子 *lpdA*、*crp* を欠失させた変異株がこのコブに対し影響を与えていることがわかった。

表 3-3 相関係数 0.4~0.6 の範囲のコブでの各株の出現回数

Strain	count	%	Strain	count	%	Strain	count	%	Strain	count	%	Strain	count	%
WT	5	4.67	hns	6	5.61	yibO	9	8.41	fbaB	5	4.67	focB	5	4.67
nhaR	6	5.61	adhE	4	3.74	glvG	6	5.61	thrA	6	5.61	glnB	6	5.61
yabN	6	5.61	pyrF	82	76.64	glvB	5	4.67	talB	6	5.61	kefB	6	5.61
aceE	100	93.46	aldH	5	4.67	glvC	5	4.67	nhaA	4	3.74	pck	6	5.61
aceF	103	96.26	adhP	6	5.61	bglB	6	5.61	kefC	6	5.61	atpH	84	78.50
lpdA	4	3.74	malX	6	5.61	metR	5	4.67	aroP	6	5.61	atpF	101	94.39
yafC	6	5.61	pykF	6	5.61	tpiA	6	5.61	ldcC	6	5.61	metL	6	5.61
adhC	6	5.61	celF	6	5.61	glpX	6	5.61	phoE	5	4.67	ppc	6	5.61
ybdO	3	2.80	pykA	5	4.67	purH	87	81.31	glnK	6	5.61	cadA	6	5.61
ybeF	6	5.61	gndC	4	3.74	acs	5	4.67	gip	6	5.61	frdD	6	5.61
pgm	5	4.67	glk	5	4.67	cadC	6	5.61	pheP	6	5.61	frdC	6	5.61
gltA	7	6.54	yabB	6	5.61	gpmG	6	5.61	speF	6	5.61	frdB	5	4.67
sucC	4	3.74	err	5	4.67	dhaL	6	5.61	sucA	3	2.80	frdA	6	5.61
galM	5	4.67	tktB	6	5.61	gapC	6	5.61	glnQ	6	5.61	sgaB	6	5.61
ybiC	6	5.61	yfhT	4	3.74	nanK	5	4.67	pflB	4	3.74	sgaE	5	4.67
Irp	6	5.61	nrdE	6	5.61	yiaY	6	5.61	focA	6	5.61	cycA	6	5.61
pflA	5	4.67	nrdF	4	3.74	crp	3	2.80	nhaB	6	5.61	arcA	4	3.74
pflB	3	2.80	ascF	6	5.61	ygaA	4	3.74	aldH	5	4.67	proY	6	5.61
acyP	6	5.61	ascB	6	5.61	pfkA	5	4.67	zwf	6	5.61	speC	6	5.61
agp	6	5.61	yglI	6	5.61	pgi	6	5.61	ackA	4	3.74			
ptsG	6	5.61	bglA	4	3.74	fbp	5	4.67	talA	4	3.74			
icdA	6	5.61	tdcD	6	5.61	pfbB	5	4.67	acrD	5	4.67			

表 3-4 相関係数 0.1~0.3 の範囲のコブでの各株の出現回数

Strain	count	%	Strain	count	%	Strain	count	%	Strain	count	%	Strain	count	%
WT	2	1.87	hns	1	0.93	yibO	4	3.74	fbaB	2	1.87	focB	2	1.87
nhaR	2	1.87	adhE	2	1.87	glvG	2	1.87	thrA	2	1.87	glnB	2	1.87
yabN	2	1.87	pyrF	2	1.87	glvB	2	1.87	talB	2	1.87	kefB	2	1.87
aceE	0	0.00	aldH	2	1.87	glvC	2	1.87	nhaA	2	1.87	pck	2	1.87
aceF	0	0.00	adhP	2	1.87	bglB	2	1.87	kefC	2	1.87	atpH	0	0.00
lpdA	95	88.79	malX	2	1.87	metR	1	0.93	aroP	2	1.87	atpF	0	0.00
yafC	2	1.87	pykF	2	1.87	tpiA	2	1.87	ldcC	2	1.87	metL	2	1.87
adhC	2	1.87	celF	2	1.87	glpX	2	1.87	phoE	2	1.87	ppc	2	1.87
ybdO	2	1.87	pykA	2	1.87	purH	3	2.80	glnK	2	1.87	cadA	2	1.87
ybeF	2	1.87	gndC	1	0.93	acs	2	1.87	gip	2	1.87	frdD	2	1.87
pgm	2	1.87	glk	2	1.87	cadC	2	1.87	pheP	2	1.87	frdC	2	1.87
gltA	2	1.87	yabB	2	1.87	gpmG	2	1.87	speF	2	1.87	frdB	2	1.87
sucC	2	1.87	crr	2	1.87	dhaL	2	1.87	sucA	3	2.80	frdA	2	1.87
galM	2	1.87	tktB	2	1.87	gapC	2	1.87	glnQ	2	1.87	sgaB	2	1.87
ybiC	2	1.87	yfhT	2	1.87	nanK	2	1.87	pflB	2	1.87	sgaE	2	1.87
lrp	2	1.87	nrdE	2	1.87	yiaY	2	1.87	focA	2	1.87	cycA	2	1.87
pflA	2	1.87	nrdF	2	1.87	crp	97	90.65	nhaB	2	1.87	arcA	3	2.80
pflB	2	1.87	ascF	2	1.87	ygaA	2	1.87	aldH	2	1.87	proY	2	1.87
acyP	2	1.87	ascB	2	1.87	pfkA	2	1.87	zwf	2	1.87	speC	2	1.87
agp	2	1.87	ygbI	2	1.87	pgi	2	1.87	ackA	2	1.87			
ptsG	2	1.87	bglA	2	1.87	fbp	0	0.00	talA	2	1.87			
icdA	2	1.87	tdcD	2	1.87	pfbB	2	1.87	acrD	2	1.87			

3-3-3 相関係数の分布の正規化

小さな2つのコブを作っていた変異株8つを除いた99株の相関係数がどのような分布を示すのか調べ、その結果を図3-3に示した。0.0~0.5の範囲に分布する相関係数はなくなり、これで前述の8つの変異株が相関係数を低くしていたことが明らかになった。

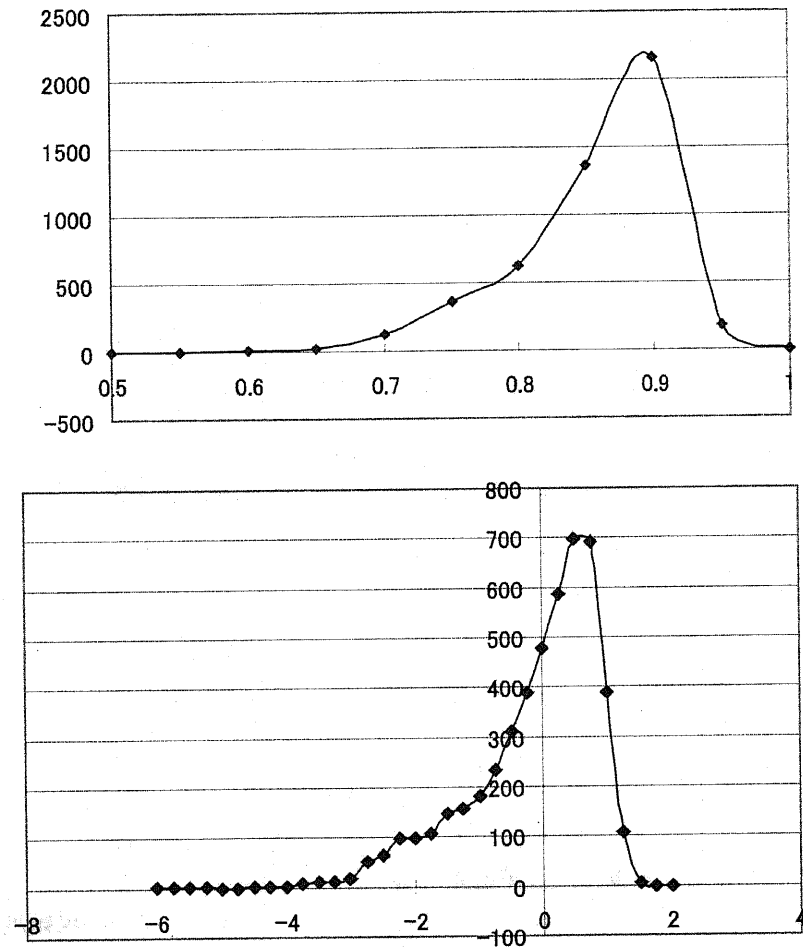


図3-3 99の実験株総当たりの相関係数の分布と正規化後の分布
上：相関係数の分布(横軸：相関係数 縦軸：頻度)
下：正規化後の分布(横軸：Zスコア 縦軸：頻度)

ここでさらに、99株の相関係数のZスコアを計算し、正規化した。このとき、Zスコアの最大値が1.57、最小値が-5.75であることをふまえ、 $\pm\sigma$ 、 $\pm1.5\sigma$ で閾値を設定し、その閾値より大きな値、小さな値をとり有意に影響を与えていると思われる株を小さなコブのときと同様の方法で調べた。その結果を図3-4に示した。図3-4の縦軸は出現回数、横軸は各株とした。

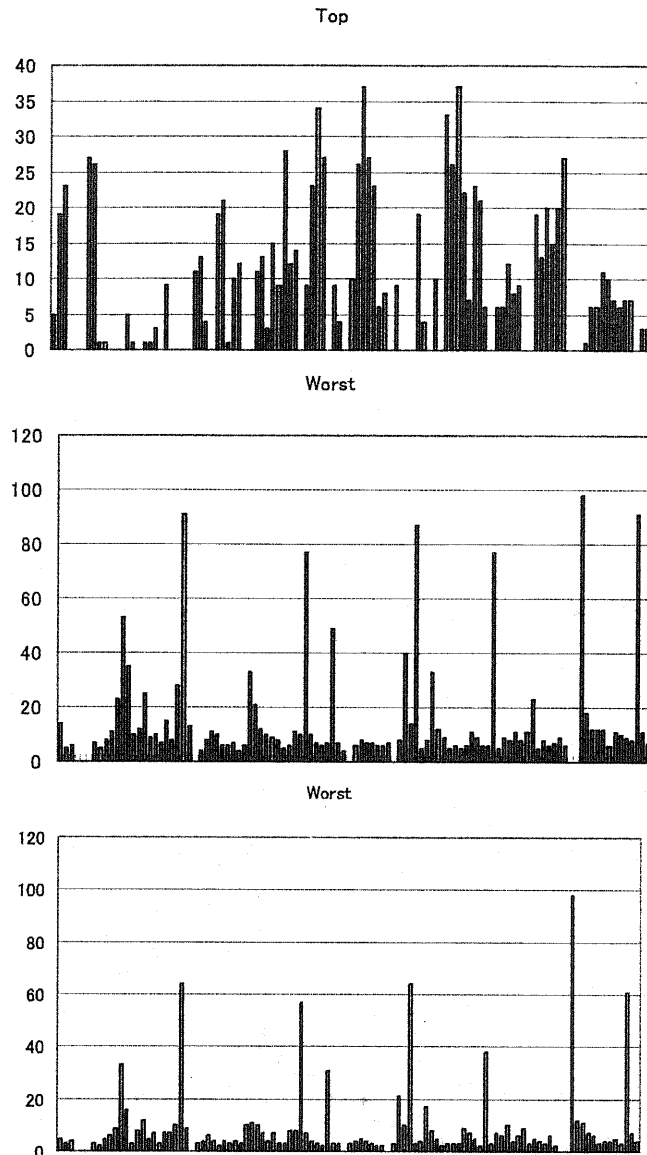


図 3-4 正規化された分布において影響を与えている実験株の出現頻度
 上： $+\sigma$ より大きいZ値をとる実験株
 中： $-\sigma$ より小さいZ値をとる実験株
 下： -1.5σ より小さいZ値をとる実験株

$\pm\sigma$ で閾値を設定したとき、上位下位ともに出現回数が20回を超える株を抽出し、それらの株を作る欠失遺伝子の機能について調べた。 $\pm 1.5\sigma$ で閾値を設定したとき、上位はほとんど閾値を超える株が存在しないため、下位に注目し出現回数が20回を超える株を抽出し、それらの株を作る欠失遺伝子の機能について調べた。表 3-5,6,7に抽出できた株と機能を示す。網掛けがされている株は機能未知遺伝子、ボールド体の株はDNA転写因子もしくはトランスポーターである。

表 3-5 $+\sigma$ より大きな値の範囲の分布に影響を与える株

gene	function
gpmG	phosphoglyceromutase
ldcC	lysine decarboxylase
glvC	arbutin specific enzyme
kefC	proton antipoter
ygbI	predict DNA binding transcriptional regulator
yafC	predict DNA binding transcriptional regulator
bglB	cryptic phosphor-beta-glucosidase
pck	phosphoenolpyruvate carboxykinase
adhC	alcohol dehydrogenase
cadC	DNA binding transcriptional activator
aroP	Aromatic amino acid transporter
yabN	predict DNA binding transcriptional regulator
glvB	arbutin specific enzyme
gapC	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
gip	hydroxypyruvate isomerase
pykA	pyruvate kinase
pheP	phenylalanine transporter
focB	formate transporter
kefB	proton antiporter

表 3-6 $-\sigma$ より小さな値の範囲の分布に影響を与える株

gene	function
hns	DNA binding transcriptional regulator
yibO	predict Phosphoglycero mutase
fbp	fructose-1,6-bisphosphatase
sucA	2-oxoglutarate decarboxylase
metL	fused aspartokinase
arcA	DNA binding response regulator
gltA	citrate synthase
metR	DNA binding transcriptional activator
pgm	phosphoglucomutase
sucC	succinyl-CoA synthase beta subunit
Irp	DNA binding transcriptional dual regulator
icdA	isocitrate dehydrogenase
crr	glucose-specific enzyme
tktB	transketolase
pfkA	6-phosphofructokinase 1
thrA	fused aspartokinase 1
ackA	acetate kinase A

表 3-7 -1.5σ より小さな値の範囲の分布に影響を与える株

gene	function
hns	DNA binding transcriptional regulator
yibO	predict Phosphoglycero mutase
fbp	fructose-1,6-bisphosphatase
sucA	2-oxoglutarate decarboxylase
metL	fused aspartokinase
arcA	DNA binding response regulator
glcA	citrate synthase
metR	DNA binding transcriptional activator
pfkA	6-phosphofructokinase 1

ここで、抽出した変異株の機能が DNA 転写因子や様々な分子のトランスポーターである割合を確認した。表 3-5 では 19 つ中 9 つ、表 3-6 では 17 つ中 4 つ、表 3-7 では 9 つ中 3 つで、それぞれ約 47.3%、23.5%、33.3%を占めていた。表 3-5 では、機能未知遺伝子を含んでおり、はっきりと機能がわかっているものだけの割合は 31.5%であった。この結果から、DNA 転写因子や分子のトランスポーターが高めの割合を占めているように見える。しかし、それらの機能を持つ変異株は本研究でデータセットとして選択した 106 株のうち 30 株、約 28.3%を占めていた。したがって、 σ で閾値を設定して抽出した変異株群に、明確な傾向があるとはいえない。

3-3-4 自己組織化マップによるクラスタリング解析

3-3-4-1 培地選択

PMシステムが用意した培地条件は表3-8に示すようにプレートごとにその組成の大まかな分類がなされている。本研究ではこの分類ごとに BL-SOM を作成し、どのようにクラスタリングされるか調べた。

表 3-8 条件の分類と条件の数

Class of sources	Number of sources
Carbon	191
Nitrogen	93
Phosphorus and Sulfur	96
Nutrient	96
Peptide Nitrogen	288
Osmolytes	94
pH	92

3-3-4-2 クラスタリング結果

以下に各条件セットによるクラスタリング結果を以下の図 3-5 に示した。

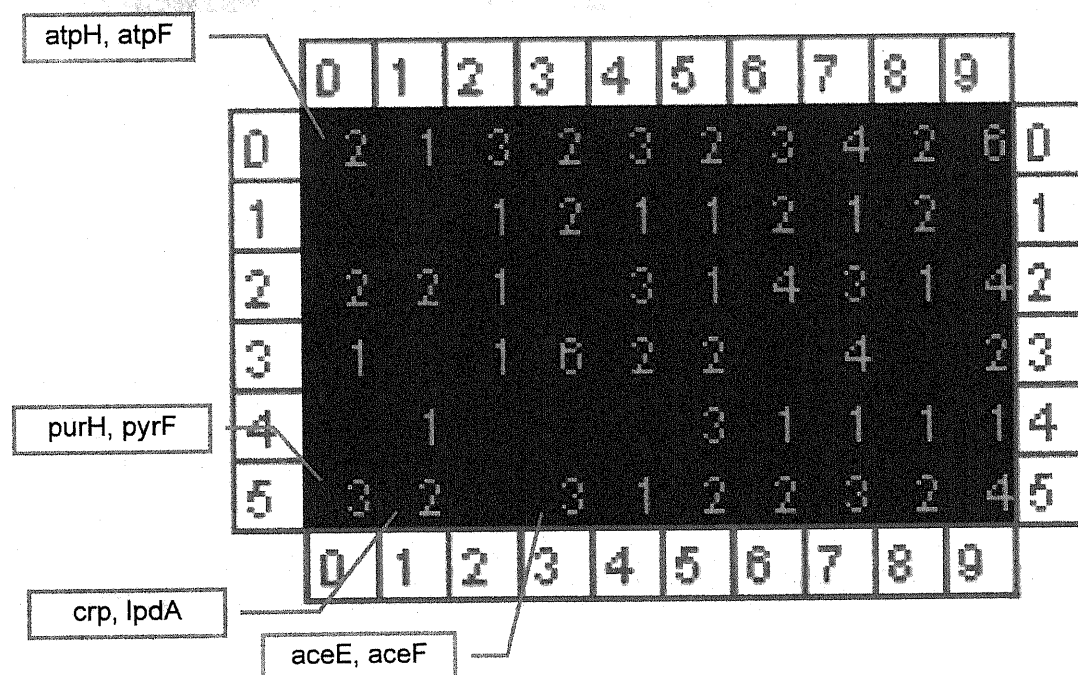


図 3-5-1 Carbon Sources を条件としたときの BL-SOM

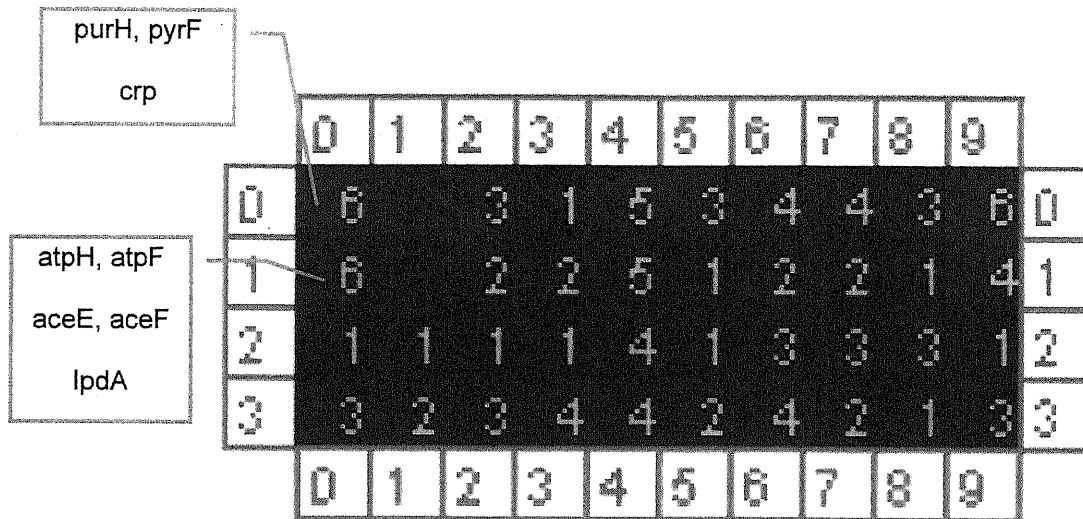


図 3-5-2 Nitrogen Sources を条件としたときの BL-SOM

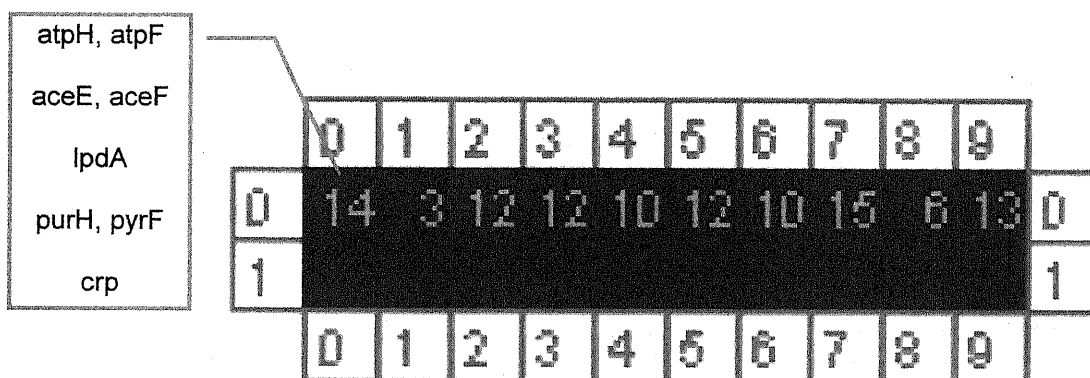


図 3-5-3 Phosphorus and Sulfur Sources を条件としたときの BL-SOM

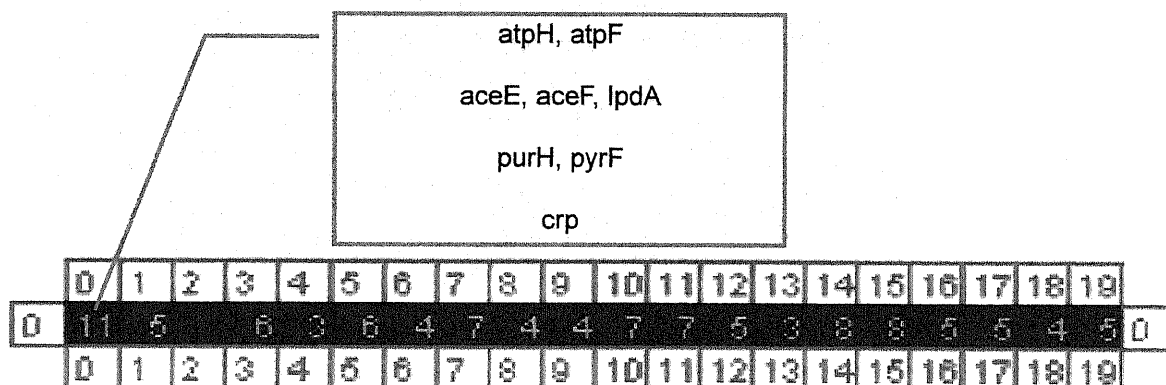


図 3-5-4 Nutrient Sources を条件としたときの BL-SOM

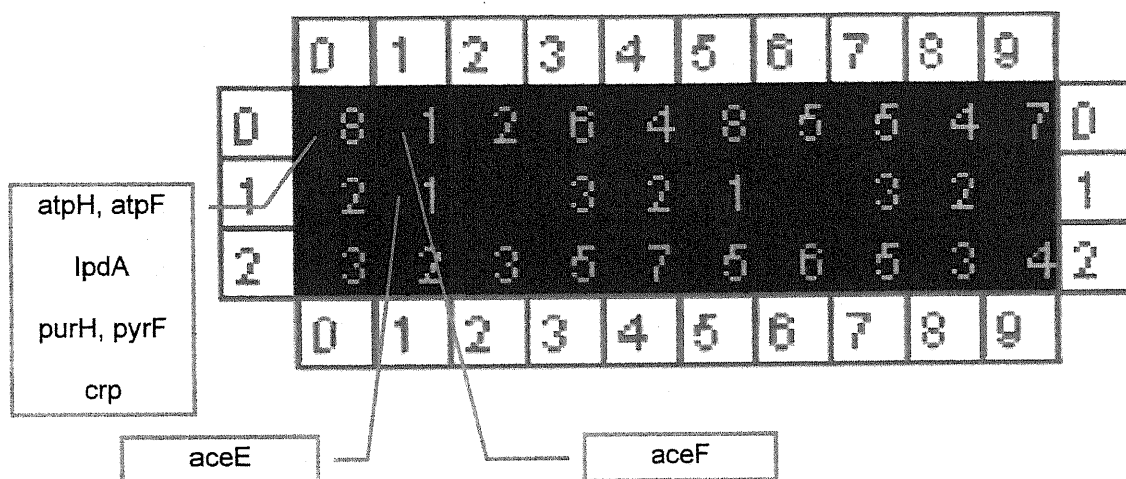


図 3-5-5 Peptide Nitrogen Sources を条件としたときの BL-SOM

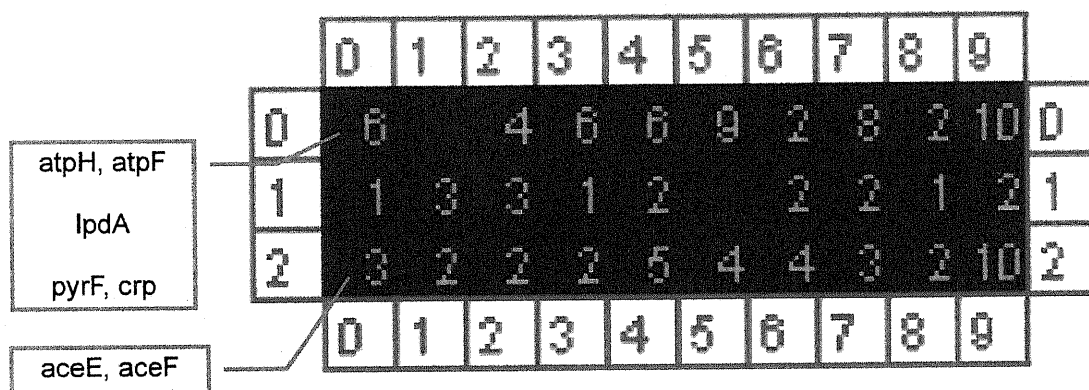


図 3-5-6 Osmolyte Sources を条件としたときの BL-SOM

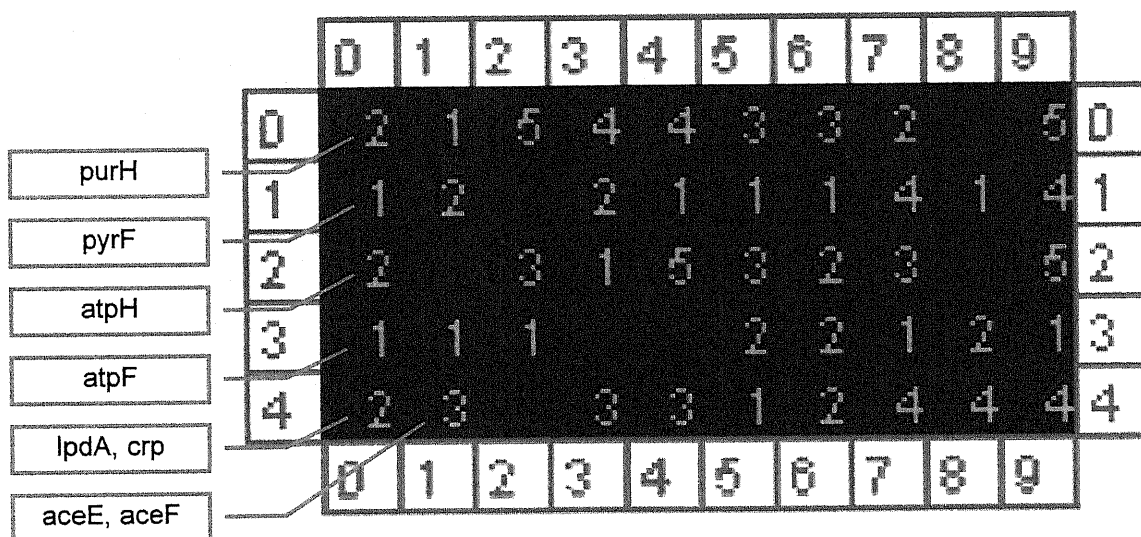


図 3-5-7 pH を条件としたときの BL-SOM

各マップのセルに示された数字はそのセルに分類された遺伝子の数を表している。グレーの吹き出しで、3-3-2 で抽出できた 8 つの株がどのセルに存在するかを示した。図 3-5 からわかるように、注目した 8 つの株は近傍のセルにクラスタリングされていた。

また、機能未知遺伝子がどのセルにクラスタリングされているか確認した。本研究のデータセットには機能未知遺伝子(y 遺伝子)欠失株が 10 個含まれている。それらの株がクラスタリングされているセルに存在する変異株を表 3-9 に示した。空欄はその y 遺伝子のみがそのセルには存在したことを意味している。表 3-9 より培地分類によって、クラスタリングされているセルに存在する変異株は変わっており、一貫して同じようにクラスタリングされてはいなかった。

表 3-9 y 遺伝子欠失株がクラスタリングされているセルに存在する変異株

	yafC	ybdO	ybeF	ybiC	yabB	yfhT	yglb	yibO	yiaY	ygaA	acyP
Carbon	nhaR	ybeF	ybdO	lrp ascF	gndC glk gapC	nrdE bglA talB nhaA nhaB	acyP adhE pflA	sucC pgi frdC	cadC ipmG	ldcC kefC cadA	pflA adhE yglb
Nitrogen	tktB ldcC	ybeF bglB aldH	ybdO bglB aldH		pykA ipmG speC	talB aroP gip ppc cadA		bglA ptsG glvB		frdB nrdF nanK nhaA pheP	acrD sgaB
Phosphorus and Sulfur	nhaR sgrR adhC pflB malX pykA glk nrdE tdcD glvG glpX ldcC ppc cadA	agp adhP celF ascB tpiA yiaY pflB fbaB nhaA phoE frdB	wt pgm galM aldH pykF nrdF acs nanK sgaE arcA ygaA	tktB ascF cadC kefC pheP speF zwf acrD pck sgaB cycA	pflA yabB ipmG dhaL gapC pflB glnB frdD proY speC	sucC gndC pflA talB aroP gip ackA talA kefB frdC yibO yglb	sucC gndC pflA talB aroP gip ackA talA kefB frdC yfhT yibO	sucC gndC pflA talB aroP gip ackA talA kefB frdC yfhT yglb	agp adhP celF ascB tpiA ybdO pflB fbaB nhaA phoE frdB	wt pgm galM aldH pykF nrdF acs nanK sgaE arcA ybeF	lrp adhE glvC bglB pgi glnQ focA aldH focB
Nutrient	pflB malX glk dhaL ppc speC	adhE adhP sgaB	galM nhaA	pflA tktB kefC zwf pck yabB	pflA tktB kefC zwf pck ybiC	gndC talB glnK frdC	bglA glvB aroP kefB	pflA gip talA	lrp celF phoE glnQ aldH frdB	icdA pykF nrdF ygaA speF	agp bglB pgi
Peptide	sgrR tktB ipmG dhaL speC	celF bglB pheP aldH acrD sgaB	adhP tpiA acs nhaA	pflB acyP adhE glvC pgi zwf focB	pck ppc cadA	sucC talB aroP gip kefB frdC	tdcD nhaB frdA yibO	tdcD nhaB frdA yglb	nrdF arcA	wt galM nanK phoE sgaE	pflB ybiC adhE glvC pgi zwf focB
Osmolyte	dhaL	pflA pflB ascB tpiA kefC arcA proY	glnK	pgi pflB focA nhaB	adhC sgrR tktB glvB metR glpX aroP talA yglb	malX pflA ppc	adhC sgrR tktB glvB metR glpX aroP talA yabB	wt agp	sgaB	pykF nrdF	gip
pH	err kefC	tktB metR fbaB proY	focB	pflA pflB		sgrR adhC pykA pck	talA	aceE aceF		adhP pykF nrdF aldH	adhE glvG

第4章 考察

4-1 概要

本章では、第2章、第3章で得た結果から、抽出した実験株群の生物学的役割及び代謝経路に対する影響に関する考察を行う。また、さらに機能未知遺伝子の機能予測への試みを行う。図4-1に概略図を示す。

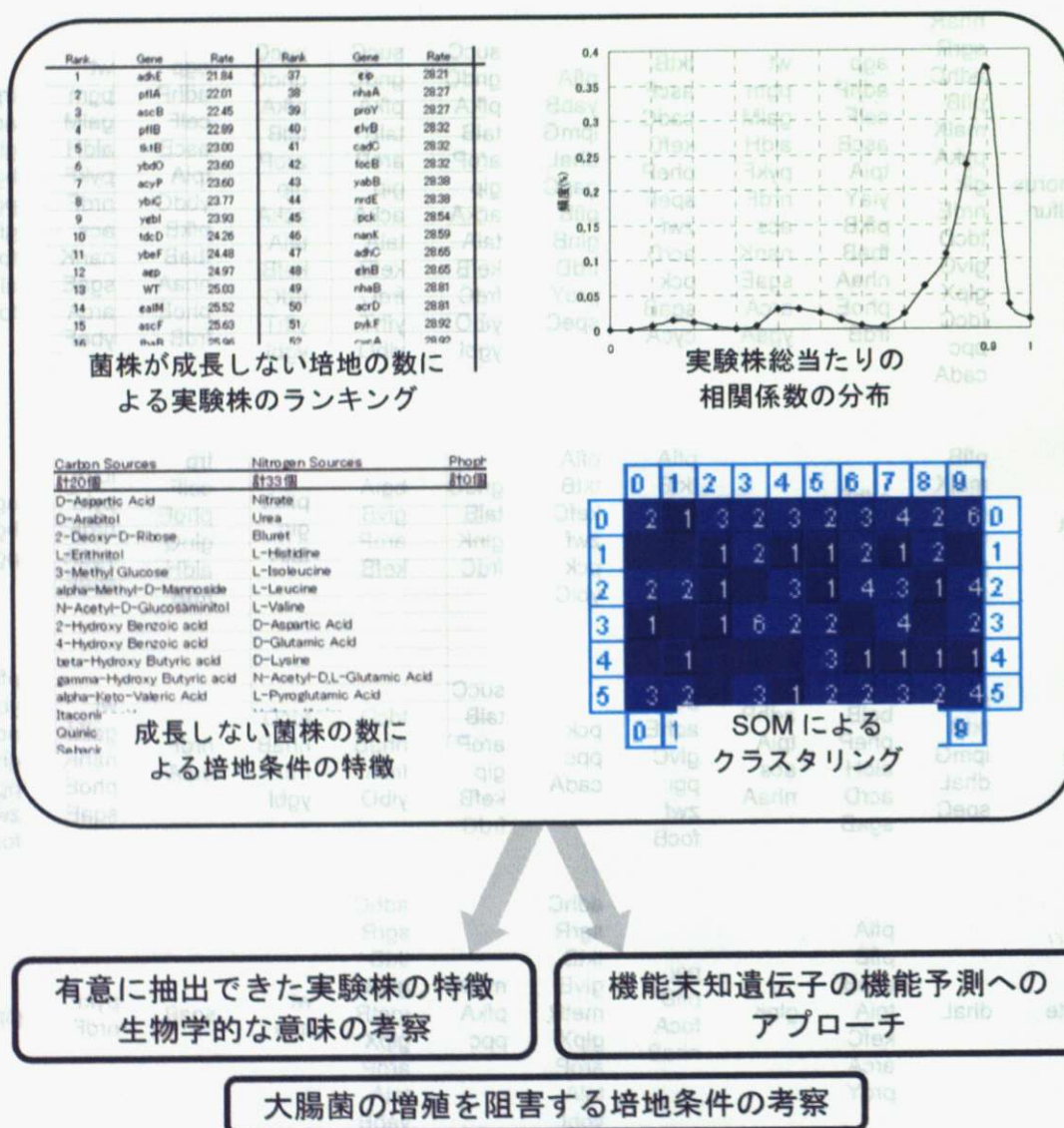


図4-1 本章の概略

4-2 表現型情報が大きく変わる8つの変異株

第3章で、実験株総当たりで算出した表現型情報ベクトルの相関係数の分布に現れた小さなコブに影響を与える変異株群と、表現型情報の値を0にする培地条件の数によるランキングを得た。この2つの結果を比べたところ、ランキングにおいて下位8位を占める実験株は、相関係数の分布で小さなコブ2つを形成していた8つの実験株であることがわかった(図4-2)。このことから、8つの株と他の株との相関係数が低い理由は8つの株において表現型情報の値が0となる培地条件が多いことであることがわかった。ここで、8つの株それぞれの機能と成長しない培地条件が多い理由を考察した。

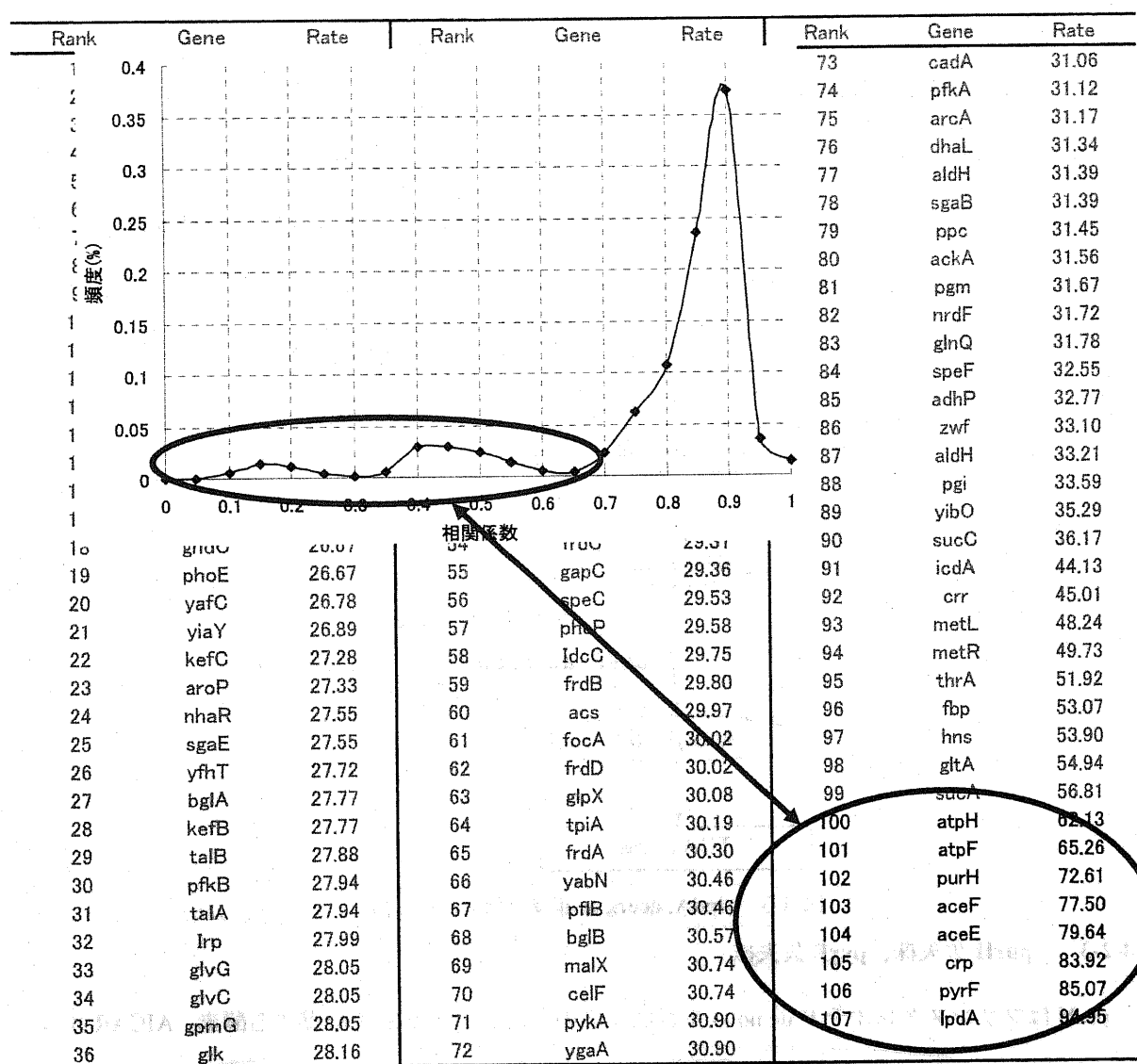


図4-2 ランキング下位8位を示す実験株と相関係数の分布のコブを形成する実験株の一致

4-2-1 lpdA 欠失株

表 3-1 によると lpdA 欠失株では約 95%の培地条件で表現型情報の値が 0 となっており、非必須遺伝子に分類されてはいるものの、非常に重要な遺伝子であるといえる。lpdA は、EcoCyc(<http://ecocyc.org/>)によるとピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(図 4-3)のほかに、2-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体(図 4-12)、グリシン開裂マルチ酵素の一部であるタンパク質をもコードしていることがわかっている。これらの酵素はすべて NADH 産生反応を触媒する酵素である。PM システムが NADH の還元力でテトラゾリウムを還元し呈色させ、その様子を観測しているシステムであることから、lpdA 欠失株では NADH 産生が行われなくなり、ほとんどの培地条件で表現型情報の値が 0 となると考えられる。

4-2-2 aceE 欠失株、aceF 欠失株

aceE と aceF は lpdA と共にピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(図 4-3)の一部をコードする遺伝子であり、NADH 産生反応を触媒する酵素を構成するタンパク質であることから、lpdA と同様に aceE 欠失株と aceF 欠失株とは NADH 産生が行われなくなることが示唆できる。また、lpdA とはオペロン構造を取っていることが既存の研究(QHG. 1994、EcoCyc)からわかっている。

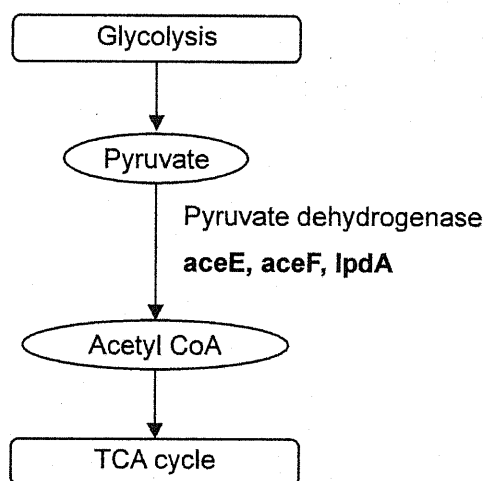


図 4-3 lpdA, aceE, aceF の経路上の位置

4-2-3 purH 欠失株、pyrF 欠失株

purH はプリンヌクレオチド de novo 生合成反応の下流 2 つの反応を触媒する酵素、AICAR ホルミルトランスフェラーゼと IMP(イノシン酸 5'-リン酸)シクロヒドロラーゼをコードしている(図

4-4)。IMP 以外の主要なプリンヌクレオチドは IMP から生成される。したがって *purH* が欠失している、つまり IMP シクロヒドロラーゼが作られないと、プリンヌクレオチドが生成されずアデニンやグアニンなどの核酸が合成されない。これは、大腸菌が生存できないことを意味する。

pyrF はピリミジンヌクレオチド *de novo* 生合成反応の最後の反応を触媒する酵素である OMP(オロチジン 5'-リン酸)デカルボキシラーゼをコードしている(図 4-5)。したがって *pyrF* が欠失している、つまり OMP デカルボキシラーゼが作られないと、ピリミジンヌクレオチドが生成されず、シトシン、チミン、ウラシルなどの核酸が合成されない。これは *purH* と同様、大腸菌が生存できないことを意味する。

しかし、表 3-1 によると表現型情報の値を 0 にする培地条件は、*purH* 欠失株では約 72%、*pyrF* 欠失株では約 85%に止まっていること、また *purH* と *pyrF* が必須遺伝子ではないことから、プリン生合成経路と、ピリミジン生合成反応経路にバイパスが存在していることが示唆された。

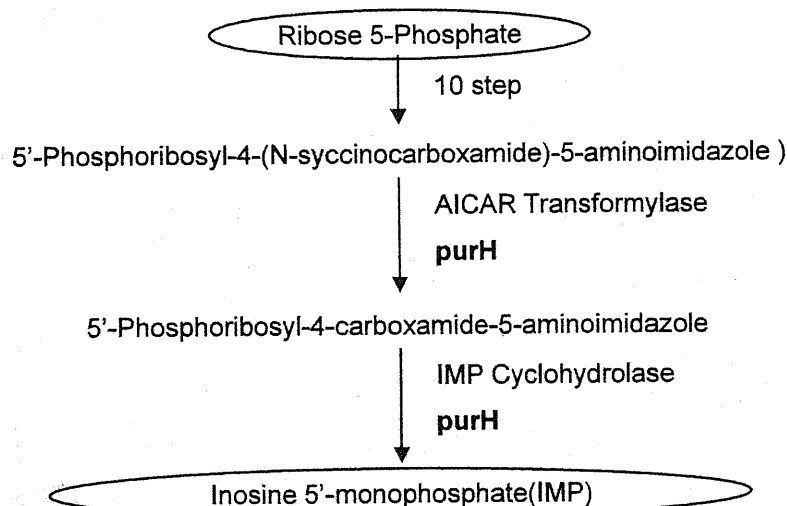


図 4-4 *purH* の経路上の位置

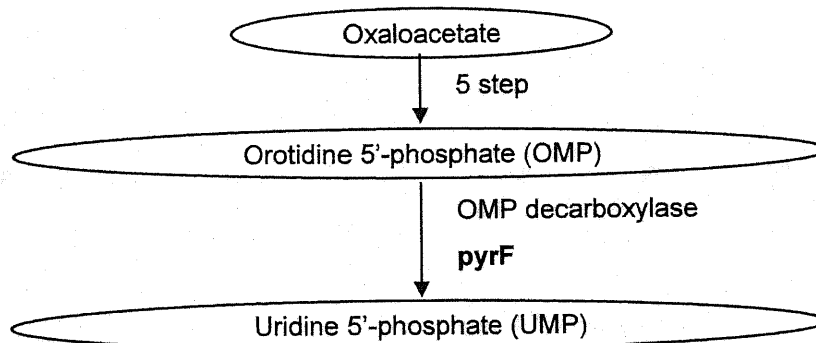


図 4-5 *pyrF* の経路上の位置

4-2-4 atpF 欠失株、atpH 欠失株

atpF、atpH は呼吸鎖複合体である ATP シンターゼをコードしている。atpF もしくは atpH が欠失していると細胞の呼吸が阻害され、菌株の増殖は阻害される。

しかし、表 3-1 によると表現型情報の値を 0 にする培地条件は atpF 欠失株、atpH 欠失株ともに約 65%に止まっている。これは、培地にグルコースが十分に含まれており、呼吸をしなくても ATP を合成できることが考えられる。atpF、atpH とともに呼吸に関わっている重要な遺伝子ではあるもののやはり非必須遺伝子であることが確認できた。

4-2-5 crp 欠失株

crp は CRP(cyclic AMP regulatory protein、サイクリック AMP 調節タンパク質)をコードしている。crp が欠失すると、DNA から RNA への転写が抑制され、細胞増殖が抑制される。表 3-1 によると、培地条件の約 84%で表現型情報の値を 0 にしているが、必須遺伝子ではないことを示しており、CRP の存在は DNA から RNA への転写に大きな影響を与えるものの、完全に転写を抑止してしまう存在ではないことが示唆できた。

以上より、他の株との相関が低い 8 つ株が欠失している遺伝子は、非必須ではあるものの、細胞の増殖に大きく関わる遺伝子であることがわかった。

4-3 菌体が増殖できない培地条件の割合が大きく変わる 14 株の変異株

表現型情報ベクトルの相関係数の分布、菌株が成長しない培地の数による実験株のランキング、SOM によるクラスタリングの結果から、表現型情報の値が 0 になる培地条件が多い変異株は、他の株と表現型情報に差がある株として抽出することができた。逆に、表現型情報ベクトルの相関係数の分布で大きな山を作る実験株群は他の株と表現型情報に大きな差がなく、3-3-3 で述べたように閾値を設定し外れ値を取る実験株にも明確な分類は存在しなかった。また、菌株が成長しない培地の数による実験株のランキングにおいても、菌体が増殖しない培地の数の割合はほとんどの実験株で 20~30%であった。SOM においても、機能ごとにクラスタリングすることができなかった。

そこで、菌体が増殖できない培地条件の傾向を探るために、PM システムでは、別表 2 に示したように培地条件がプレートごとに大きく分類されており、またさらにウェルごとに組成が設定されている。そこで、表 3-8 に示す分類を用い、各実験株の表現型情報の値が 0 になる培地条件の数をカウントした。図 4-7 に縦軸に表現型情報の値が 0 になる培地条件の数の割合、横軸に培地分類をとり、各実験株でプロットした図を示した。

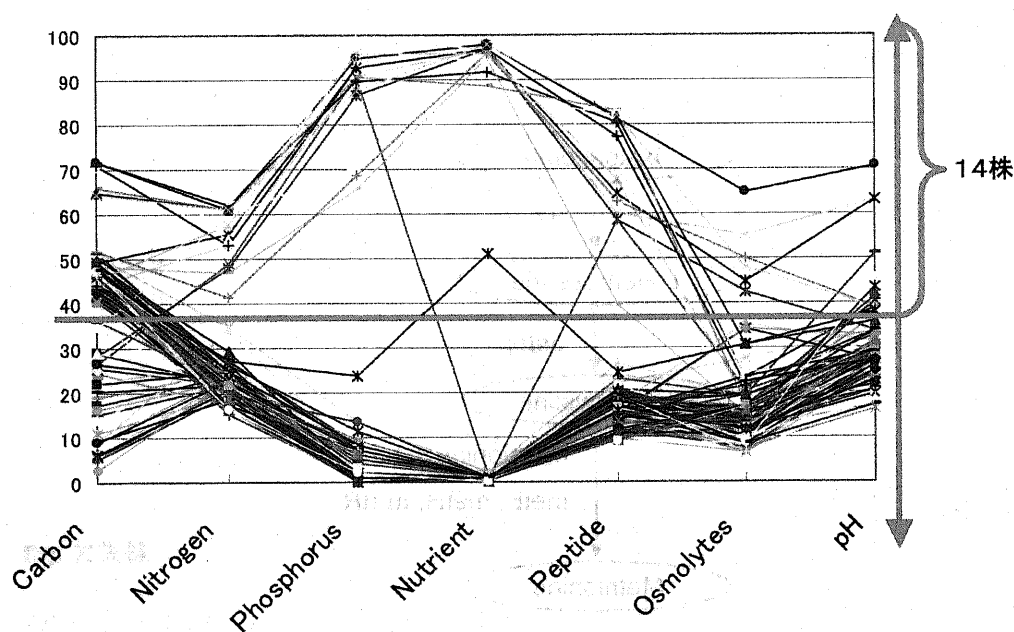


図 4-7 増殖できない培地条件の数の割合

図 4-7 に示したように、実験株を Phosphorus and Sulfur Sources と Nutrient Sources と Peptide Sources で増殖できない培地条件の数の特徴から、大きく 2 つのグループに分けることができた。ここで、それらの培地分類で増殖できない培地条件が多い実験株を調べた。その結果、この変異株群は菌株が成長しない培地の数による実験株のランキングにおいて、下位 14 位を占める変異株であることがわかった。ここで 4-2 に述べた 8 つの変異株のほかに新たに抽出できた 6 つの変異株の機能と、それらが育たない培地条件が多い理由を考察した。

4-4-1 metR 欠失株

metR はメチオニンシンターゼをコードしている(図 4-8)。metR が欠失するとメチオニンの生合成が阻害される。メチオニンは開始コドンであるコドン AUG にコードされている。つまり DNA 転写活性化因子である。したがって、metR が欠失していると、DNA からタンパク質への転写が減少し、細胞の増殖が減る。

表 3-1 によると表現型情報の値を 0 にする培地条件は metR 欠失株では約 50% である。これは、大腸菌では開始コドンはメチオニンだけではないこととメチオニンを添加している培地条件が存在していることが原因であると考えられる。しかし、培地条件の全体の 50% という数字は大きな値であるので、メチオニンが大腸菌の増殖において重要なアミノ酸であること、metR が重要な遺伝子であることが示唆できた。

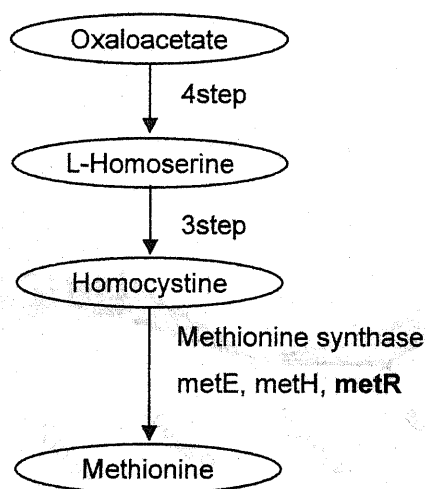


図 4-8 metR の経路上の位置

4-4-2 thrA 欠失株

thrA はアスパルテートキナーゼとホモセリンデヒドロゲナーゼの 2 つの機能を持つ酵素をコードしている(図 4-9)。これらの酵素はそれぞれオキサロ酢酸からホモセリンを生合成する経路における反応を触媒する酵素である。ホモセリンはスレオニンを生合成するために用いられる。また、オキサロ酢酸からアスパルテートを経由して L-アスパルチル-4 リン酸が合成されるが、L-アスパルチル-4-リン酸を用いてリシンが生合成される。したがって、thrA はスレオニンとリシンを生合成するために重要な酵素をコードしているといえる。

また、thrA は表 3-1 で示した表現型情報の値を 0 にする培地条件のランキングで 2 位違いの metL とアイソザイムである。表 3-1 によると、表現型情報の値を 0 にする培地条件の割合は thrA、metL それぞれ約 48%、約 52%とほぼ同じの値を示している。

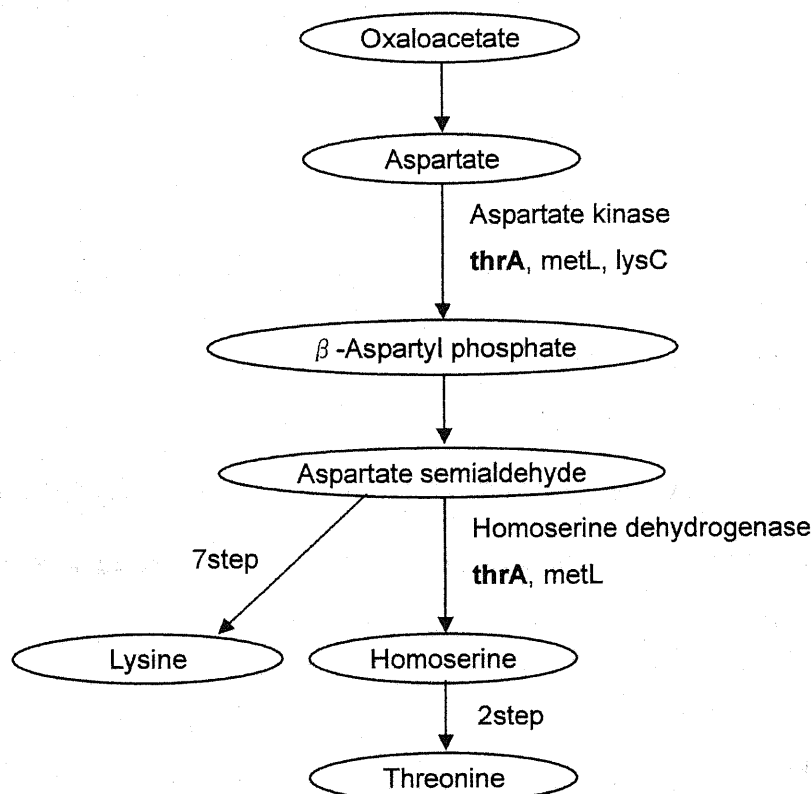


図 4-9 thrA の経路上の位置

4-4-3 fbp 欠失株

fbp はフルクトース 1,6-ビスフォスファターゼをコードしている(図 4-10)。この酵素は糖新生において重要な反応を触媒する。また、エネルギー産生において、ボトルネックであることが知られている。図 4-7 で示した結果でさらに対象とする実験株を解糖系及びペントースリン酸経路に

関わる遺伝子欠失株のみに絞った結果を図 4-11 に示した。図 4-11 から *fbp* が他の解糖系・ペントースリン酸経路の遺伝子と顕著に異なっていることがわかる。したがって *fbp* が NADH 産生に大きく関わっている遺伝子であることを示すことができた。

4-4-4 *hns* 欠失株

hns は耐熱性核様体タンパク質(H-NS)をコードしている。EcoCyc によると、H-NS は環境の変化への反応や様々なストレスへの適応において多くの遺伝子の制御を行う上で重要な役割を果たしている。すなわち H-NS は転写制御因子となる。また *hns* は他の H-NS をコードする遺伝子の制御因子でもあり、非常に重要な遺伝子となっている。

核様体は DNA が存在する領域であり、核様体が減少することは菌体の生存を減少させることに繋がる。したがって、*hns* は菌体の生存に重要な役割を果たす遺伝子であることを示すことができた。

4-4-5 *gltA* 欠失株

gltA はクエン酸塩シンターゼをコードしている(図 4-10)。TCA サイクルにおいて、オキサロ酢酸とアセチル CoA とが反応してクエン酸塩を生合成する反応を触媒している。したがって TCA サイクルにおいて非常に重要な遺伝子であるといえる。

しかし、表 3-1 によると *gltA* における表現型情報の値を 0 にする培地条件は全体の約 55%に留まっており、これは *gltA* 以外にクエン酸塩シンターゼ、もしくはクエン酸塩シンターゼと同様の働きをする酵素を大腸菌が生合成できることを示唆している。

4-4-6 *sucA* 欠失株

sucA は 2-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の一部をコードしている(図 4-10)。この複合体には *lpdA* がコードするタンパク質も含まれている。TCA サイクルにおいて 2-ケトグルタル酸からスクシニル CoA を生合成する反応を触媒する酵素であり、重要な役割を果たしている。

表 3-1 によると *sucA* における表現型情報の値を 0 にする培地条件は全体の約 57%に止まってい

る。TCA サイクルにはいくつかバイパスが存在することがすでにわかっている。この結果より、*sucA* が欠失すると成長は大きく阻害されるが、*sucA* が非必須遺伝子であること、バイパスが存在することを裏付けることができた。

このように、遺伝子欠失による表現型情報への影響は、菌体が成長しない培地条件の数が多い変異株に対してははっきりと観察できることがわかった。



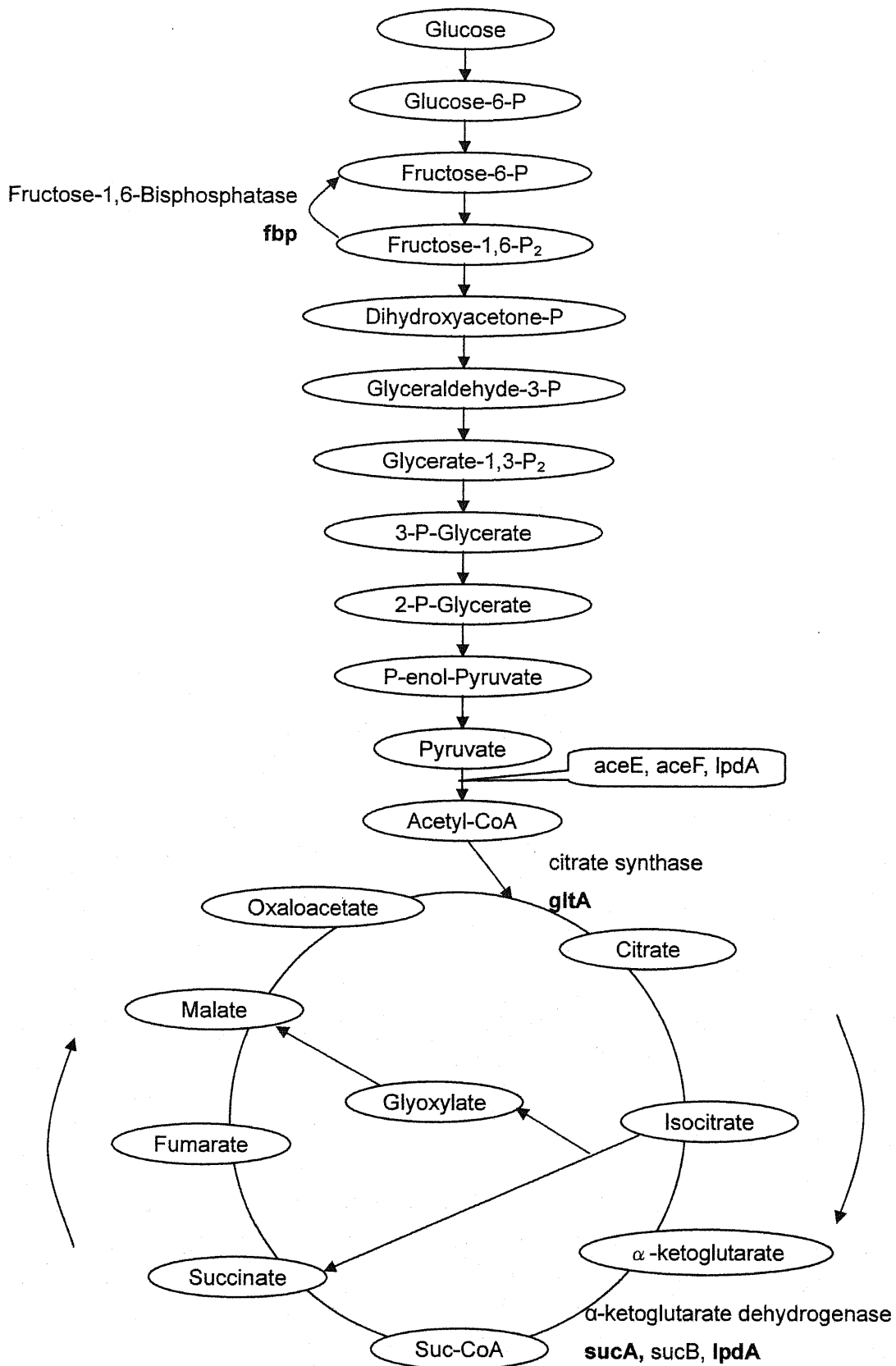


図 4-10 fbp、gltA、sucA の経路上の位置
解糖系、TCA サイクルに存在する

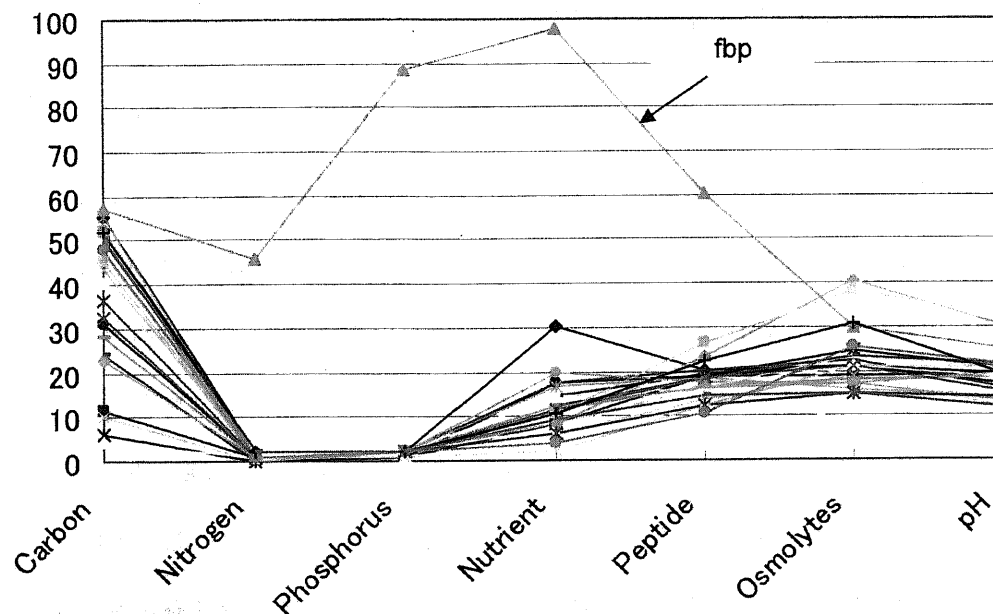


図 4-11 変異株を解糖系・PPP に絞ったときの増殖できない培地条件の数の割合

4-5 菌体が増殖できない培地条件の特徴

3-3 で菌体が成長できない培地条件を調査し、表 3-2 に結果を示した。その結果によると、バリン、イソロイシン、ロイシン、ヒスチジンが含まれる培地は成長に強く影響を与えていることがわかった。また、4-4 で調べた、菌体が成長できない培地条件の傾向からも、アミノ酸、ペプチドが各株の特徴を顕著に示すことがわかった。このことから、アミノ酸、ペプチドを代謝する能力が大腸菌の成長に影響を与えている可能性を示唆することができた。

4-6 まとめ

本章で、表現型情報において大きな変化を示す遺伝子を 14 つ抽出することができた。それらの遺伝子は、非必須遺伝子ではあるものの、大腸菌の細胞増殖過程において大きな影響を与えていた。このことからヌクレオチド生合成に関するバイパスの存在の可能性や、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの重要性を示唆することができた。また、培地条件の特徴から特定のアミノ酸が細胞増殖を大きく阻害していることがわかった。これらのことから、細胞増殖に大きく影響を与える遺伝子を限定し、新たな知見を加えることができたと考える。

第5章 結論と今後の展望

本研究は、Keio Collection から得た 106 の遺伝子欠失株と野生株の計 107 株を Phenotype MicroArrays システムに適用し、網羅的に取得した約 400000 の NADH 産生に関する経時変化データを解析した。その表現型データからは表現型情報としていくつかの指標が抽出できたが、バラツキ、再現性の観点から NADH 産生速度を抽出した。既存の研究では、呈色の有無のみや経時変化データのプロットを重ねて比較していたが、それらとは違った相対的に比較のできる新たな指標を設定することができた。また、抽出した表現型情報を書く実験株で培地条件次元のベクトルとして整理し、さらにデータ全体を実験株と培地条件によるマトリクスとして整理した。

このマトリクスを用いていくつかの統計解析を行った。表現型情報の値全体の分布を調べた結果、0 となるものが非常に多いことがわかった。また、各実験株の表現型情報ベクトルの相関係数を算出した。その相関係数の分布には 2 つの小さなコブと 1 つの大きな山が存在した。

表現型情報の値が 0 となる培地条件の数の割合を各変異株において算出し、それを元に割合が小さい順のランキングを作った。また、相関係数の分布において小さなコブを作っている変異株を調べた。結果、ランキング下位 8 位の変異株と小さなコブを作っている変異株は一致した。このことから、8 つの株が他の株との相関が低い理由は表現型情報の値を 0 にする培地条件を多く持つことであることがわかった。また、simple BL-SOM によってクラスタリングを行ったところ、前述の 8 つの変異株は近傍にクラスタリングすることができた。しかし、残りの 99 の実験株は相関係数の分布においても、SOM においても分類することはできなかった。

以上の結果をふまえ、第 4 章で考察を行った。その結果、表現型情報を 0 にする培地条件を多く持つ 14 つの変異株を抽出することができ、またそれらの機能、経路における役割、生物学的意味を示唆することができ、代謝ネットワークにおける新たな経路の存在を示すこともできた。

本研究の手法では、変異株の多くは細胞増殖に関する表現型では遺伝子欠失の影響を観察することができなかった。これは、解析で扱った培地条件が多すぎ、解析量を算出した際に詳細の特徴を抽出できなかったことが原因であると考えられる。これは、どの遺伝子欠失株でも成長できない培地条件の存在や逆にどの遺伝子欠失株でも成長できる培地条件が存在することから、さらに特

徴を抽出しやすい培地条件に条件を絞り込み、変異株同士を比較することで、新たな知見を得ることが可能であると考え。これらは今後の解析に向けての課題である。

謝辞

本研究は平成 18 年 4 月から 19 年 2 月までの約 2 年間、東京大学大学院新領域創成科学研究科情報生命科学専攻有田研究室で行われたものです。

本研究を行うにあたり、あらゆる面において、終始丁寧に粘り強くご指導ご鞭撻を賜りました有田正規准教授に、深く感謝いたします。また、データを提供くださいました奈良先端科学技術大学院大学の森浩禎教授、アキシオヘリクス社のスハルナン氏に感謝いたします。

私の大学院生活におきまして、研究及び様々な局面で貴重な助言、強力なサポートをいただきました、東京大学大学院新領域創成科学研究科情報生命科学専攻高木研究室の岩崎渉氏に心から感謝いたします。また、多くの助言、励ましをいただきました有田研究室の新旧メンバーのみなさま、浅井研究室のみなさま、産総研生命情報工学センターのみなさま、理化学研究所植物科学研究センターのみなさま、刺激を与え合った同期の皆に感謝します。

最後に、毎日の生活に対する理解と全面的な協力で私を支え続けてくれた家族に感謝の意を表します。

参考文献

[BAH 2006]

Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knock-out mutants : the Keio collection., *Molecular Systems Biology*, **2**, 2006.0008.

[BMB 2003]

Beckonert O, Monnerjahn J, Bonk U, Leibfritz D. (2003). Visualizing metabolic changes in breast-cancer tissue using ^1H -NMR spectroscopy and self-organizing maps., *NMR Biomed.* **16**, 1-11

[BGP 2001]

Bochner BR, Gadzinski P, Panomitros E. (2001). Phenotype MicroArrays for High-Throughput Phenotypic Testing and Assay of Gene Function., *Genome Res.*, **11**, 1246-1255.

[DW 2000]

Datsenko KA, Wanner BL. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products., *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 6640-6645.

[Grant 2008]

Grant CM. (2008). Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress., *Journal of Biology.*, **7**, 1-4

[ISH 2007]

Inoue T, Shingaki R, Hirose S, Waki K, Mori H, Fukui K. (2007). Genome-Wide Screening of Genes Required for Swarming Motility in *Escherichia coli* K-12., *Journal of Bacteriology*, **189**(3), 950-957.

[KDG 2002]

Kalelkar S, Dow ER, Grimes J, Clapham M, Hu H. (2002). Automated analysis of proton NMR spectra from combinatorial rapid parallel synthesis using self-organizing maps., *J. Comb. Chem.*, **4**, 622-629

[KKA 2001]

Kanaya S, Kinouchi M, Abe T, Kudo Y, Yamada Y, Nishi T, Mori H, Ikemura T. (2001). Analysis of codon usage diversity of bacterial genes with a self-organizing map (SOM): characterization of horizontally transferred genes with emphasis on the *E. coli* O157 genome, *Gene*, **276**, 89-99

[KK 1996]

Kangas J, Kohonen T. (1996). Developments and applications of self-organizing map and related algorithms., *Mathematics and Computers in Simulation*, **41**, 3-12.

[KMA 2007]

Kern R, Malki A, Abdallah J, Tagourti J, Richarme G. (2007). *Escherichia coli* HdeB Is an Acid Stress Chaperone., *Journal of Bacteriology*, **189**(2), 603-610.

[HHE 2001]

Hyvönen MT, Hiltunen Y, El-Deredy W, Ojala T, Vaara J, Kovanen PT, Ala-Korpela M. (2001). Application of self-organizing maps in conformational analysis of lipids. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 810-816

[MPB 2002]

Marvroudi S, Papadimitriou S, Bezerianos A. (2002). Gene expression data analysis with a dynamically extended self-organized map that exploits class information., *Bioinformatics*, **18**(11), 1446-1453.

[QHG 1994]

Quail MA, Haydon DJ, Guest JR. (1994). The *pdhR-aceEF-lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex., *Molecular Microbiology*, **12**(1), 95-104

[SGS 2003]

Scholz M, Gatzek S, Sterling A, Fiehn O, Selbig J. (2003). Metabolite fingerprinting : detecting biological features by independent component analysis., *Bioinformatics*, **20**(15), 2447-2454

[ULK 2003]

Urbanczyk-Wochniak E, Luedemann A, Kopka J, Selbig J, Roessber-Tunali U, Willmitzer L, Fernie AR. (2003). Parallel analysis of transcript and metabolic profiles : a new approach in systems biology, *EMBO reports* **4**(10) 989-993

[WHL 2003]

Ward JL, Harris C, Lewis J, Beale MH. (2003). Assessment of ¹H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolic fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*, *Phytochemistry*, **62**, 949-957

[ZLB 2003]

Zhou L, Lei X, Bochner BR, Wanner BL. (2003). Phenotype MicroArray Analysis of *Escherichia coli* K-12 Mutants with Deletions of all Two-Component Systems., *Journal of Bacteriology*, **185**(16), 4956-4972.

河原央明. (2006). 定量化された大腸菌表現型情報に基づく遺伝子ネットワーク解析., 奈良先端科学技術大学院大学修士論文

[NCI 1996]

Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE. *Escherichia coli and Salmonella* CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY 1996

市原清志. バイオサイエンスの統計学 1990

斎藤輪太郎 バイオインフォマティクスの基礎 ゲノム解析プログラミングを中心に 2005

ホートン. (1998). 生化学 (原著第2版)

涌井良幸, 涌井貞美. 図解でわかる多変量解析 2001

別表

別表 1-1 Keio Collection から選択した変異株の情報

JWID	Gene	function	Pathway
JW0019	nhaR	DNA-binding transcriptional activator	
JW0068	yabN	DNA-binding transcriptional regulator	
JW0110	aceE	Pyruvate dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW0111	aceF	pyruvate dehydrogenase, dihydrolipoyltransacetylase component E2	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW0112	lpdA	lipoamide dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase,	Glycolysis Glycine,serine and threonine metabolism/pyruvate metabolism
JW0198	yafC	predicted DNA-binding transcriptional regulator	
JW0347	adhC	alcohol dehydrogenase classIII glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW0596	ybdO	predicted DNA-binding transcriptional regulator	
JW0624	ybeF	predicted DNA-binding transcriptional regulator	
JW0675	pgm	phosphoglucomutase	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW0710	gltA	citrate synthase	TCA cycle
JW0717	sucC	succinyl-CoA synthetase, beta subunit	TCA cycle
JW0739	galM	galactose-1-epimerase (mutarotase)	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW0786	ybiC	predicted dehydrogenase	TCA cycle
JW0872	lrp	DNA-binding transcriptional dual regulator, leucine-binding	
JW0885	pflA	pyruvate formate lyase activating enzyme 1	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW0886	pflB	pyruvate formate lyase I	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW0951	acyP	predicted acylphosphatase	
JW0987	agp	glucose-1-phosphatase/inositol phosphatase	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW1087	ptsG	fused glucose-specific PTS enzymes: IIBcomponent IIC component	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW1122	icdA	e14 prophage; isocitrate dehydrogenase, specific for NADP+	TCA cycle
JW1225	hns	global DNA-binding transcriptional dual regulator H-NS fused acetaldehyde-CoAdehydrogenase	
JW1228	adhE	iron-dependent alcoholdehydrogenase pyruvate-formate lyase deactivase	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW1273	pyrF	orotidine-5'-phosphate decarboxylase	nucleotide
JW1293	aldH	gamma-Glu-gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase, NAD(P)H-dependent	fermentation
JW1474	adhP	alcohol dehydrogenase, 1-propanol preferring	fermentation
JW1613	malX	fused maltose and glucose-specific PTS enzymes: IIB component -I IIC component	PTS
JW1666	pykF	pyruvate kinase I	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW1723	celF	cryptic phospho-beta-glucosidase, NAD(P)-binding	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW1843	pykA	pyruvate kinase II	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW2011	gndC	gluconate-6-phosphate dehydrogenase, decarboxylating	Pentose phosphate pathway
JW2385	glk	glucokinase	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW2396	yabB	predicted DNA-binding transcriptional activator	
JW2410	crp	glucose-specific enzyme IIA component of PTS	PTS
JW2449	tktB	transketolase 2, thiamin-binding	Pentose phosphate pathway
JW2521	yfhT	DNA-binding transcriptional activator of 3-phenylpropionic acid catabolism	
JW2650	nrdE	ribonucleoside-diphosphate reductase 2, alpha subunit	nucleotide
JW2651	nrdF	ribonucleoside-diphosphate reductase 2, beta subunit, ferritin-like	nucleotide
JW2685	ascF	fused cellobiose/arbutin/salicin-specific PTSenzymes: IIB component/IIC component	PTS
JW2686	ascB	cryptic 6-phospho-beta-glucosidase	PTS
JW2705	ygbI	predicted DNA-binding transcriptional regulator	
JW2869	bglA	6-phospho-beta-glucosidase A	sugar catabolize
JW3086	tdcD	propionate kinase/acetate kinase C, anaerobic	

別表 1-2 Keio Collection から選択した変異株の情報

JWID	Gene	function	Pathway
JW3587	yibO	predicted phosphoglycero mutase III, cofactor-independent	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW3658	glvG	protein (pseudogene) probable 6-phospho-beta-glucosidase	TCA cycle
JW3659	glvB	arbutin specific enzyme IIC component of PTS	PTS
JW3660	glvC	arbutin specific enzyme IIC component of PTS	PTS
JW3699	bglB	cryptic phospho-beta-glucosidase B	sugar catabolize
JW3804	metR	DNA-binding transcriptional activator, homocysteine-binding	
JW3890	tpiA	triosephosphate isomerase	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW3896	glpX	fructose 1,6-bisphosphatase II	
JW3970	purH	IMPcyclohydrolase/phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	nucleotide
JW4030	acs	acetyl-CoA synthetase	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW4094	cadC	DNA-binding transcriptional activator	
JW4358	gpmG	phosphoglyceromutase 2, co-factor independent	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW5186	dhaL	dihydroxyacetone kinase, C-terminal domain	fermentation
JW5223	gapC	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis
JW5538	nanK	predicted N-acetylmannosamine kinase	
JW5648	yiaY	predicted Fe-containing alcohol dehydrogenase	
JW3320	crp	DNA-binding transcriptional dual regulator	
JW5843	ygaA	predicted DNA-binding transcriptional activator	
JW3887	pfkA	6-phosphofructokinase I	Glycolysis
JW3985	pgi	glucosephosphate isomerase	Glycolysis
JW4191	fbp	fructose-1,6-bisphosphatase I	Glycolysis
JW5280	pfkB	6-phosphofructokinase II	Glycolysis
JW5344	fbaB	fructose-bisphosphate aldolase class I	Glycolysis
JW0001	thrA	fused aspartokinase I and homoserine dehydrogenase I"	amino acid
JW0007	talB	Transaldolase B	Pentose phosphate pathway
JW0018	nhaA	sodium-proton antiporter	
JW0046	kefC	potassium:proton antiporter	
JW0108	aroP	Aromatic amino acid transport protein AroP	
JW0181	ldcC	lysine decarboxylase 2, constitutive	Lysine degradation Alkaloid biosynthesis II
JW0231	phoE	outer membrane phosphoprotein protein E	
JW0440	glnK	nitrogen assimilation regulatory protein for GlnL, GlnE, and AmtB	
JW0496	gip	hydroxypyruvate isomerase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism
JW0565	pheP	phenylalanine transporter	
JW0680	speF	ornithine decarboxylase isozyme, inducible	amino acid
JW0715	sucA	2-oxoglutarate decarboxylase, thiamin-requiring	TCA cycle
JW0794	glnQ	glutamine transporter subunit	
JW0886	pfkB	pyruvate formate lyase I	
JW0887	focA	formate transporter	
JW1175	nhaB	sodium:proton antiporter	
JW1293	aldH	gamma-Glu-gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase, NAD(P)H-dependent	
JW1841	zwf	glucose-6-phosphate dehydrogenase"	Pentose phosphate pathway
JW2293	ackA	acetate kinase A and propionate kinase 2"	Pyruvate metabolism, Propanoate metabolism
JW2448	talA	transaldolase A	Pentose phosphate pathway
JW2454	acrD	aminoglycoside/multidrug efflux system	
JW2477	focB	predicted formate transporter	
JW2537	glnB	regulatory protein P-II for glutamine synthetase	
JW3313	kefB	potassium:proton antiporter	
JW3366	pck	phosphoenolpyruvate carboxykinase	
JW3713	atpH	ATP synthase delta chain	Oxidative phosphorylation, ATP synthesis
JW3714	atpF	ATP synthase c chain	Oxidative phosphorylation, ATP synthesis

別表 1-3 Keio Collection から選択した変異株の情報

JWID	Gene	function	Pathway
JW3911	metL	fused aspartokinase II/homoserine dehydrogenase II	amino acid
JW3928	ppc	Phosphoenolpyruvate carboxylase	TCA cycle
JW4092	cadA	Lysine decarboxyase	amino acid
JW4112	frdD	fumarate reductase (anaerobic), membrane anchor subunit"	TCA cycle
JW4113	frdC	fumarate reductase (anaerobic), membrane anchor subunit	TCA cycle
JW4114	frdB	fumarate reductase (anaerobic), Fe-S subunit	TCA cycle
JW4115	frdA	fumarate reductase (anaerobic) catalytic andNAD flavoprotein subunit	TCA cycle
JW4152	sgaB	L-ascorbate-specific enzyme IIB component of PTS	PTS
JW4156	sgaE	L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase	
JW4166	cycA	D-alanine/D-serine/glycine transporter"	
JW4364	arcA	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with ArcB or CpxA	
JW5055	proY	predicted cryptic proline transporter	
JW5482	speC	ornithine decarboxylase, constitutive	amino acid

別表2 培地条件の分類と詳細な組成

以下、Biolog 社の HP から提供されているファイルより転載

BIOLOG**Phenotype MicroArrays™****CONFIDENTIAL – DO NOT COPY OR CIRCULATE****PM1 MicroPlate™ Carbon Sources**

A1 Negative Control	A2 L-Arabinose	A3 N-Acetyl-D-Glucosamine	A4 D-Saccharic Acid	A5 Succinic Acid	A6 D-Galactose	A7 L-Aspartic Acid	A8 L-Proline	A9 D-Alanine	A10 D-Trehalose	A11 D-Mannose	A12 Dulcitol
B1 D-Serine	B2 D-Sorbitol	B3 Glycerol	B4 L-Fucose	B5 D-Gluconic Acid	B6 D-Gluconic Acid	B7 D,L-α-Glycerol-Phosphate	B8 D-Xylose	B9 L-Lactic Acid	B10 Formic Acid	B11 D-Mannitol	B12 L-Glutamic Acid
C1 D-Glucose-6-Phosphate	C2 D-Galactonic Acid-γ-Lactone	C3 D,L-Malic Acid	C4 D-Ribose	C5 Tween 20	C6 L-Rhamnose	C7 D-Fructose	C8 Acetic Acid	C9 α-D-Glucose	C10 Maltose	C11 D-Melibiose	C12 Thymidine
D-1 L-Asparagine	D2 D-Aspartic Acid	D3 D-Gluconamic Acid	D4 1,2-Propanediol	D5 Tween 40	D6 α-Keto-Glutaric Acid	D7 α-Keto-Butyric Acid	D8 α-Methyl-D-Galactoside	D9 α-D-Lactose	D10 Lactulose	D11 Sucrose	D12 Uridine
E1 L-Glutamine	E2 m-Tartaric Acid	E3 D-Glucose-1-Phosphate	E4 D-Fructose-6-Phosphate	E5 Tween 80	E6 α-Hydroxy Glutaric Acid-γ-Lactone	E7 α-Hydroxy Butyric Acid	E8 β-Methyl-D-Glucoside	E9 Adonitol	E10 Maltotriose	E11 2-Deoxy Adenosine	E12 Adenosine
F1 Glycyl-L-Aspartic Acid	F2 Citric Acid	F3 M-Inositol	F4 D-Threonine	F5 Fumaric Acid	F6 Bromo Succinic Acid	F7 Propionic Acid	F8 Mucic Acid	F9 Glycolic Acid	F10 Glyoxylic Acid	F11 D-Cellobiose	F12 Inosine
G1 Glycyl-L-Glutamic Acid	G2 Tricarballic Acid	G3 L-Serine	G4 L-Threonine	G5 L-Alanine	G6 L-Alanyl-Glycine	G7 Acetoacetic Acid	G8 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	G9 Mono Methyl Succinate	G10 Methyl Pyruvate	G11 L-Malic Acid	G12 L-Malic Acid
H1 Glycyl-L-Proline	H2 p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H3 m-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H4 Tyramine	H5 D-Palmitic	H6 L-Lyxose	H7 Glucuronamide	H8 Pyruvic Acid	H9 Galactonic Acid-γ-Lactone	H10 D-Galacturonic Acid	H11 Phenylethylamine	H12 2-Aminonethanol

PM2A MicroPlate™ Carbon Sources

A1 Negative Control	A2 Chondroitin sulfate C	A3 α-Cyclodextrin	A4 β-Cyclodextrin	A5 γ-Cyclodextrin	A6 Dextrin	A7 Gelatin	A8 Glycogen	A9 Inulin	A10 Laminarin	A11 Mannan	A12 Pectin
B1 N-Acetyl-D-Galactosamine	B2 N-Acetyl-Neuraminic Acid	B3 β-D-Altose	B4 Amygdalin	B5 D-Arabinose	B6 D-Arabitol	B7 L-Arabitol	B8 Arbutin	B9 2-Deoxy-D-Ribose	B10 L-Erythritol	B11 D-Fucose	B12 3-O-β-D-Galactopyranosyl-D-Arabinose
C1 Gentobiose	C2 L-Glucose	C3 Lactitol	C4 D-Melezitose	C5 Maltitol	C6 α-Methyl-D-Glucoside	C7 β-Methyl-D-Galactoside	C8 3-Methyl Glucose	C9 β-Methyl-D-Glucuronic Acid	C10 α-Methyl-D-Mannoside	C11 β-Methyl-D-Xyloside	C12 Palatinose
D1 D-Raffinose	D2 Selitin	D3 Sedoheptulosan	D4 L-Sorbose	D5 Stachyose	D6 D-Tagatose	D7 Turanose	D8 Xylitol	D9 N-Acetyl-D-Glucosaminitol	D10 γ-Amino Butyric Acid	D11 β-Amino Valeric Acid	D12 Butyric Acid
E1 Capric Acid	E2 Caproic Acid	E3 Citraconic Acid	E4 Citramalic Acid	E5 D-Gluconamine	E6 2-Hydroxy Benzole Acid	E7 4-Hydroxy Benzole Acid	E8 β-Hydroxy Butyric Acid	E9 γ-Hydroxy Butyric Acid	E10 α-Keto-Valeric Acid	E11 Itaconic Acid	E12 3-Keto-D-Gluconic Acid
F1 D-Lactic Acid Methyl Ester	F2 Malonic Acid	F3 Malibonic Acid	F4 Oxalic Acid	F5 Oxalomalic Acid	F6 Quinic Acid	F7 D-Ribono-1,4-Lactone	F8 Sebacic Acid	F9 Sorbic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 D-Tartaric Acid	F12 L-Tartaric Acid
G1 Acetamide	G2 L-Alaninamide	G3 N-Acetyl-L-Glutamic Acid	G4 L-Arginine	G5 Glycine	G6 L-Histidine	G7 L-Homoserine	G8 Hydroxy-L-Proline	G9 L-Isoleucine	G10 L-Leucine	G11 L-Lysine	G12 L-Methionine
H1 L-Ornithine	H2 L-Phenylalanine	H3 L-Proglutamic Acid	H4 L-Valine	H5 D,L-Carnitine	H6 Iso-Butylamine	H7 D,L-Octopamine	H8 Putrescine	H9 Dihydroxy Acetone	H10 2,3-Butanediol	H11 2,3-Butanone	H12 3-Hydroxy 2-Butanone

Confidential

PM3B MicroPlate™ Nitrogen Sources

A1 Negative Control	A2 Ammonia	A3 Nitrite	A4 Nitrate	A5 Urea	A6 Burex	A7 L-Alanine	A8 L-Arginine	A9 L-Asparagine	A10 L-Aspartic Acid	A11 L-Cysteine	A12 L-Glutamic Acid
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L-Phenylalanine	B9 L-Proline	B10 L-Serine	B11 L-Threonine	B12 L-Tryptophan
C1 L-Tyrosine	C2 L-Valine	C3 D-Alanine	C4 D-Asparagine	C5 D-Aspartic Acid	C6 D-Glutamic Acid	C7 D-Lysine	C8 D-Serine	C9 D-Valine	C10 L-Citrulline	C11 L-Homoserine	C12 L-Ornithine
D-1 N-Acetyl-D,L-Glutamic Acid	D2 N-Phthaloyl-L-Glutamic Acid	D3 L-Pyroglutamic Acid	D4 Hydroxylamine	D5 Methylamine	D6 N-Amylamine	D7 N-Butylamine	D8 Ethylamine	D9 Ethanolamine	D10 Ethylenediamine	D11 Putrescine	D12 Agmatine
E1 Histamine	E2 5-Phenylbutylamine	E3 Tyramine	E4 Acetamide	E5 Formamide	E6 Glucosamine	E7 D,L-Lactamide	E8 D-Glucosamine	E9 D-Galactosamine	E10 D-Mannosamine	E11 N-Acetyl-D-Glucosamine	E12 N-Acetyl-D-Galactosamine
F1 N-Acetyl-D-Mannosamine	F2 Adenine	F3 Adenosine	F4 Cytidine	F5 Cytosine	F6 Guanine	F7 Guanosine	F8 Thymine	F9 Thymidine	F10 Uracil	F11 Uridine	F12 Inosine
G1 Xanthine	G2 Xanthosine	G3 Uric Acid	G4 Alloxan	G5 Alanitol	G6 Parabanic Acid	G7 D,L-α-Amino-N-Butyric Acid	G8 γ-Amino-N-Butyric Acid	G9 α-Amino-N-Caproic Acid	G10 D,L-α-Amino-Caprylic Acid	G11 β-Amino-N-Valeric Acid	G12 α-Amino-N-Valeric Acid
H1 Ala-Asp	H2 Ala-Gln	H3 Ala-Glu	H4 Ala-Gly	H5 Ala-His	H6 Ala-Leu	H7 Ala-Thr	H8 Gly-Asp	H9 Gly-Gln	H10 Gly-Glu	H11 Gly-Met	H12 Met-Ala

PM4A MicroPlate™ Phosphorus and Sulfur Sources

A1 Negative Control	A2 Phosphate	A3 Pyrophosphate	A4 Trimeta-phosphate	A5 Triphosphosphate	A6 Trisubyl Phosphate	A7 Hypophosphite	A8 Adenosine-2'-monophosphate	A9 Adenosine-3'-monophosphate	A10 Adenosine-5'-monophosphate	A11 Adenosine-2',3'-cyclic monophosphate	A12 Adenosine-3',5'-cyclic monophosphate
B1 Thiophosphate	B2 Dithiophosphate	B3 D,L-α-Glycerol Phosphate	B4 β-Glycerol Phosphate	B5 Carbamyl Phosphate	B6 D-2-Phospho-Glyceric Acid	B7 D-3-Phospho-Glyceric Acid	B8 Guanosine-2'-monophosphate	B9 Guanosine-3'-monophosphate	B10 Guanosine-5'-monophosphate	B11 Guanosine-2',3'-cyclic monophosphate	B12 Guanosine-3',5'-cyclic monophosphate
C1 Phosphoenol Pyruvate	C2 Phospho-Glycolic Acid	C3 D-Glucose-1-Phosphate	C4 D-Glucose-6-Phosphate	C5 2-Deoxy-D-Glucose 6-Phosphate	C6 D-Glucosamine-6-Phosphate	C7 6-Phospho-Gluconic Acid	C8 Cytidine-2'-monophosphate	C9 Cytidine-3'-monophosphate	C10 Cytidine-5'-monophosphate	C11 Cytidine-2',3'-cyclic monophosphate	C12 Cytidine-3',5'-cyclic monophosphate
D1 D-Mannose-1-Phosphate	D2 D-Mannose-6-Phosphate	D3 Cytosamine-8-Phosphate	D4 Phospho-L-Arginine	D5 α-Phospho-D-Serine	D6 α-Phospho-L-Serine	D7 α-Phospho-L-Threonine	D8 Uridine-2'-monophosphate	D9 Uridine-3'-monophosphate	D10 Uridine-5'-monophosphate	D11 Uridine-2',3'-cyclic monophosphate	D12 Uridine-3',5'-cyclic monophosphate
E1 O-Phospho-D-Tyrosine	E2 O-Phospho-L-Tyrosine	E3 Phosphocreatine	E4 Phosphoryl Choline	E5 O-Phosphoryl-Ethanolamine	E6 Phosphono Acetic Acid	E7 2-Aminoethyl Phosphonic Acid	E8 Methylaes Diphosphate Acid	E9 Thymidine-3'-monophosphate	E10 Thymidine-5'-monophosphate	E11 Inositol Hexaphosphate	E12 Thymidine 3',5'-cyclic monophosphate
F1 Negative Control	F2 Sulfate	F3 Thiosulfate	F4 Tetrathionate	F5 Thiophosphate	F6 Dithiophosphate	F7 L-Cysteine	F8 D-Cysteine	F9 L-Cysteinyl-Glycine	F10 L-Cystalic Acid	F11 Cysteamine	F12 L-Cysteine Sulfonic Acid
G1 N-Acetyl-L-Cysteine	G2 S-Methyl-L-Cysteine	G3 Cystathionine	G4 Lanthionine	G5 Glutathione	G6 D,L-Ethionine	G7 L-Methionine	G8 D-Methionine	G9 Glycyl-L-Methionine	G10 N-Acetyl-D,L-Methionine	G11 L-Methionine Sulfonide	G12 L-Methionine Sulfone
H1 L-D-Jerkolic Acid	H2 Thiourea	H3 1-Thio-β-D-Glucose	H4 D,L-Lipoamide	H5 Taurocholic Acid	H6 Taurine	H7 Hypotauroine	H8 p-Amino Benzoic Sulfonic Acid	H9 Butane Sulfonic Acid	H10 2-Hydroxyethane Sulfonic Acid	H11 Methane Sulfonic Acid	H12 Tetramethylene Sulfone

Confidential

CONFIDENTIAL – DO NOT COPY OR CIRCULATE

PM5 MicroPlate™ Nutrient Supplements

A1 Negative Control	A2 Positive Control	A3 L-Alanine	A4 L-Arginine	A5 L-Asparagine	A6 L-Aspartic Acid	A7 L-Cysteine	A8 L-Glutamic Acid	A9 Adenosine-3',5'-cyclic monophosphate	A10 Adenosine	A11 Adenosine	A12 2'-Deoxy Adenosine
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L-Phenylalanine	B9 Guanosine-3',5'-cyclic monophosphate	B10 Guanosine	B11 Guanosine	B12 2'-Deoxy Guanosine
C1 L-Proline	C2 L-Serine	C3 L-Threonine	C4 L-Tryptophan	C5 L-Tyrosine	C6 L-Valine	C7 L-Isoleucine - L-Valine	C8 trans-4-Hydroxy L-Proline	C9 (S) 4-Amino-Indazole-4(3H)-Carboxamide	C10 Hypoxanthine	C11 Inosine	C12 2'-Deoxy Inosine
D1 L-Ornithine	D2 L-Citrulline	D3 Chorismic Acid	D4 γ-Aminobutyric Acid	D5 L-Homoserine Lactone	D6 D-Alanine	D7 D-Aspartic Acid	D8 D-Glutamic Acid	D9 D,L-α,ε-Diamino-pimelic Acid	D10 Cytosine	D11 Cytidine	D12 2'-Deoxy Cytidine
E1 Putrescine	E2 Spermidine	E3 Spermine	E4 Pyridoxine	E5 Pyridoxal	E6 Pyridoxamine	E7 β-Alanine	E8 D-Pantothenic Acid	E9 Oxalic Acid	E10 Uracil	E11 Uridine	E12 2'-Deoxy Uridine
F1 Guanoic Acid	F2 Nicotinic Acid	F3 Nicotinamide	F4 β-Nicotinamide Adenosine Dinucleotide	F5 β-Amino-Levulinic Acid	F6 Hematin	F7 Dehydroxamine Mesylate	F8 D-(-)-Glucose	F9 N-Acetyl D-Glucosamine	F10 Thymine	F11 Glutathione (reduced form)	F12 Thymidine
G1 Oxaloacetic Acid	G2 D-Biotin	G3 Cyanocobalamin	G4 β-Amino-Benzoic Acid	G5 Folic Acid	G6 Inosine + Thiamine	G7 Thiamine	G8 Thiamine Pyrophosphate	G9 Riboflavin	G10 Pyridoxo-Quinolone Glutamine	G11 Menadione	G12 Myo-inositol
H1 Butyric Acid	H2 D,L-α-Hydroxy-Butyric Acid	H3 α-Ketobutyric Acid	H4 Caprylic Acid	H5 D,L-α-Lipoic Acid (oxidized form)	H6 D,L-Mevalonic Acid	H7 D,L-Carnitine	H8 Choline	H9 Tween 20	H10 Tween 40	H11 Tween 60	H12 Tween 80

PM6 MicroPlate™ Peptide Nitrogen sources

A1 Negative Control	A2 Positive Control: L-Glutamine	A3 Ala-Ala	A4 Ala-Arg	A5 Ala-Aan	A6 Ala-Glu	A7 Ala-Gly	A8 Ala-His	A9 Ala-Leu	A10 Ala-Lys	A11 Ala-Phe	A12 Ala-Pro
B1 Ala-Ser	B2 Ala-Thr	B3 Ala-Trp	B4 Ala-Tyr	B5 Arg-Ala	B6 Arg-Arg	B7 Arg-Asp	B8 Arg-Gln	B9 Arg-Glu	B10 Arg-Ser	B11 Arg-Leu	B12 Arg-Lys
C1 Arg-Met	C2 Arg-Phe	C3 Arg-Ser	C4 Arg-Trp	C5 Arg-Tyr	C6 Arg-Val	C7 Asn-Glu	C8 Asn-Val	C9 Asp-Asp	C10 Asp-Glu	C11 Asp-Leu	C12 Asp-Lys
D1 Asp-Phe	D2 Asp-Trp	D3 Asp-Val	D4 Cys-Gly	D5 Glu-Gln	D6 Glu-Gly	D7 Glu-Asp	D8 Glu-Glu	D9 Glu-Gly	D10 Glu-Ser	D11 Glu-Trp	D12 Glu-Tyr
E1 Glu-Val	E2 Gly-Ala	E3 Gly-Arg	E4 Gly-Cys	E5 Gly-Gly	E6 Gly-His	E7 Gly-Leu	E8 Gly-Lys	E9 Gly-Met	E10 Gly-Phe	E11 Gly-Pro	E12 Gly-Ser
F1 Gly-Thr	F2 Gly-Trp	F3 Gly-Tyr	F4 Gly-Val	F5 His-Asp	F6 His-Gly	F7 His-Leu	F8 His-Lys	F9 His-Met	F10 His-Pro	F11 His-Ser	F12 His-Trp
G1 His-Tyr	G2 His-Val	G3 Ile-Ala	G4 Ile-Arg	G5 Ile-Gln	G6 Ile-Gly	G7 Ile-His	G8 Ile-Ser	G9 Ile-Met	G10 Ile-Phe	G11 Ile-Pro	G12 Ile-Ser
H1 Ile-Trp	H2 Ile-Tyr	H3 Ile-Val	H4 Leu-Ala	H5 Leu-Arg	H6 Leu-Asp	H7 Leu-Glu	H8 Leu-Gly	H9 Leu-Ile	H10 Leu-Leu	H11 Leu-Met	H12 Leu-Phe

Confidential

PM7 MicroPlate™ Peptide Nitrogen sources

A1 Negative Control	A2 Positive Control: L-Glutamine	A3 Leu-Ser	A4 Leu-Trp	A5 Leu-Val	A6 Lys-Ala	A7 Lys-Arg	A8 Lys-Glu	A9 Lys-Ile	A10 Lys-Leu	A11 Lys-Lys	A12 Lys-Phe
B1 Lys-Pro	B2 Lys-Ser	B3 Lys-Thr	B4 Lys-Trp	B5 Lys-Tyr	B6 Lys-Val	B7 Met-Arg	B8 Met-Asp	B9 Met-Gln	B10 Met-Glu	B11 Met-Gly	B12 Met-Ile
C1 Met-Ile	C2 Met-Leu	C3 Met-Lys	C4 Met-Met	C5 Met-Phe	C6 Met-Pro	C7 Met-Trp	C8 Met-Val	C9 Phe-Ala	C10 Phe-Gly	C11 Phe-Ile	C12 Phe-Phe
D1 Phe-Pro	D2 Phe-Ser	D3 Phe-Trp	D4 Pro-Ala	D5 Pro-Asp	D6 Pro-Gln	D7 Pro-Gly	D8 Pro-Hyp	D9 Pro-Leu	D10 Pro-Phe	D11 Pro-Pro	D12 Pro-Tyr
E1 Ser-Ala	E2 Ser-Gly	E3 Ser-Ile	E4 Ser-Leu	E5 Ser-Met	E6 Ser-Phe	E7 Ser-Pro	E8 Ser-Ser	E9 Ser-Tyr	E10 Ser-Val	E11 Thr-Ala	E12 Thr-Arg
F1 Thr-Glu	F2 Thr-Gly	F3 Thr-Leu	F4 Thr-Met	F5 Thr-Pro	F6 Trp-Ala	F7 Trp-Arg	F8 Trp-Asp	F9 Trp-Glu	F10 Trp-Gly	F11 Trp-Leu	F12 Trp-Lys
G1 Trp-Phe	G2 Trp-Ser	G3 Trp-Trp	G4 Tyr-Tyr	G5 Tyr-Ala	G6 Tyr-Gln	G7 Tyr-Glu	G8 Tyr-Gly	G9 Tyr-Ile	G10 Tyr-Leu	G11 Tyr-Lys	G12 Tyr-Phe
H1 Tyr-Trp	H2 Tyr-Tyr	H3 Val-Arg	H4 Val-Asn	H5 Val-Asp	H6 Val-Gly	H7 Val-Ile	H8 Val-Ile	H9 Val-Leu	H10 Val-Tyr	H11 Val-Val	H12 Y-Glu-Gly

PM8 MicroPlate™ Peptide Nitrogen sources

A1 Negative Control	A2 Positive Control: L-Glutamine	A3 Ala-Asp	A4 Ala-Gln	A5 Ala-Ile	A6 Ala-Met	A7 Ala-Val	A8 Asp-Ala	A9 Asp-Gln	A10 Asp-Gly	A11 Gln-Ala	A12 Gly-Asn
B1 Gly-Asp	B2 Gly-Ile	B3 His-Ala	B4 His-Glu	B5 His-Ile	B6 Ile-Asn	B7 Ile-Leu	B8 Leu-Ala	B9 Leu-Ile	B10 Leu-Pro	B11 Leu-Tyr	B12 Lys-Asp
C1 Lys-Gly	C2 Lys-Met	C3 Met-Thr	C4 Met-Tyr	C5 Phe-Asp	C6 Phe-Glu	C7 Gln-Glu	C8 Phe-Met	C9 Phe-Tyr	C10 Phe-Val	C11 Pro-Arg	C12 Pro-Asn
D1 Pro-Glu	D2 Pro-Ile	D3 Pro-Lys	D4 Pro-Ser	D5 Pro-Trp	D6 Pro-Val	D7 Ser-Asn	D8 Ser-Asp	D9 Ser-Gln	D10 Ser-Glu	D11 Thr-Asp	D12 Thr-Gln
E1 Thr-Phe	E2 Thr-Ser	E3 Trp-Val	E4 Tyr-Ile	E5 Tyr-Val	E6 Val-Ala	E7 Val-Gln	E8 Val-Glu	E9 Val-Lys	E10 Val-Met	E11 Val-Phe	E12 Val-Pro
F1 Val-Ser	F2 β-Ala-Ala	F3 β-Ala-Gly	F4 β-Ala-Ile	F5 Met-β-Ala	F6 β-Ala-Phe	F7 D-Ala-D-Ala	F8 D-Ala-Gly	F9 D-Ala-Leu	F10 D-Leu-D-Leu	F11 D-Leu-Gly	F12 D-Leu-Tyr
G1 Y-Glu-Gly	G2 Y-D-Glu-Gly	G3 Gly-D-Ala	G4 Gly-D-Asp	G5 Gly-D-Ser	G6 Gly-D-Thr	G7 Gly-D-Val	G8 Leu-β-Ala	G9 Leu-D-Leu	G10 Phe-β-Ala	G11 Ala-Ala-Ala	G12 D-Ala-Gly-Gly
H1 Gly-Gly-Ala	H2 Gly-Gly-D-Leu	H3 Gly-Gly-Gly	H4 Gly-Gly-Ile	H5 Gly-Gly-Leu	H6 Gly-Gly-Phe	H7 Val-Tyr-Val	H8 Gly-Phe-Phe	H9 Leu-Gly-Gly	H10 Leu-Leu-Leu	H11 Phe-Gly-Gly	H12 Tyr-Gly-Gly

Confidential

CONFIDENTIAL – DO NOT COPY OR CIRCULATE

PM9 MicroPlate™ Osmolytes

A1 NaCl 1%	A2 NaCl 2%	A3 NaCl 3%	A4 NaCl 4%	A5 NaCl 5%	A6 NaCl 5.5%	A7 NaCl 6%	A8 NaCl 6.5%	A9 NaCl 7%	A10 NaCl 8%	A11 NaCl 9%	A12 NaCl 10%
B1 NaCl 6%	B2 NaCl 6% + Betaine	B3 NaCl 6% + N-Acetyl glycine	B4 NaCl 6% + Serosoline	B5 NaCl 6% + Dimethyl sulphonyl propionate	B6 NaCl 6% + MOPS	B7 NaCl 6% + Ecdaine	B8 NaCl 6% + Choline	B9 NaCl 6% + Phosphoryl choline	B10 NaCl 6% + Creatine	B11 NaCl 6% + Creatinine	B12 NaCl 6% + L-Carnitine
C1 NaCl 6% + KCl	C2 NaCl 6% + L-proline	C3 NaCl 6% + N-Acetyl L-glutamine	C4 NaCl 6% + β-Glutamic acid	C5 NaCl 6% + γ-Amino-n-butyric acid	C6 NaCl 6% + Glutathione	C7 NaCl 6% + Glycerol	C8 NaCl 6% + Trehalose	C9 NaCl 6% + Trimethylamine-N-oxide	C10 NaCl 6% + Trimethylamine	C11 NaCl 6% + Octopine	C12 NaCl 6% + Tryptosine
D1 Potassium chloride 3%	D2 Potassium chloride 4%	D3 Potassium chloride 5%	D4 Potassium chloride 6%	D5 Sodium sulfate 2%	D6 Sodium sulfate 3%	D7 Sodium sulfate 4%	D8 Sodium sulfate 5%	D9 Ethylene glycol 3%	D10 Ethylene glycol 10%	D11 Ethylene glycol 15%	D12 Ethylene glycol 20%
E1 Sodium formate 1%	E2 Sodium formate 2%	E3 Sodium formate 3%	E4 Sodium formate 4%	E5 Sodium formate 5%	E6 Sodium formate 6%	E7 Urea 2%	E8 Urea 4%	E9 Urea 6%	E10 Urea 8%	E11 Urea 9%	E12 Urea 7%
F1 Sodium Lactate 1%	F2 Sodium Lactate 2%	F3 Sodium Lactate 3%	F4 Sodium Lactate 4%	F5 Sodium Lactate 5%	F6 Sodium Lactate 6%	F7 Sodium Lactate 7%	F8 Sodium Lactate 8%	F9 Sodium Lactate 9%	F10 Sodium Lactate 10%	F11 Sodium Lactate 11%	F12 Sodium Lactate 12%
G1 Sodium Phosphate pH 7 20mM	G2 Sodium Phosphate pH 7 50mM	G3 Sodium Phosphate pH 7 100mM	G4 Sodium Phosphate pH 7 200mM	G5 Sodium Benzoate pH 5.2 20mM	G6 Sodium Benzoate pH 5.2 50mM	G7 Sodium Benzoate pH 5.2 100mM	G8 Sodium Benzoate pH 5.2 200mM	G9 Ammonium sulfate pH 8 10mM	G10 Ammonium sulfate pH 8 20mM	G11 Ammonium sulfate pH 6 50mM	G12 Ammonium sulfate pH 8 100mM
H1 Sodium Nitrate 10mM	H2 Sodium Nitrate 20mM	H3 Sodium Nitrate 40mM	H4 Sodium Nitrate 60mM	H5 Sodium Nitrate 80mM	H6 Sodium Nitrate 100mM	H7 Sodium Nitrate 120mM	H8 Sodium Nitrate 20mM	H9 Sodium Nitrate 40mM	H10 Sodium Nitrate 60mM	H11 Sodium Nitrate 80mM	H12 Sodium Nitrate 100mM

PM10 MicroPlate™ pH

A1 pH 3.5	A2 pH 4	A3 pH 4.5	A4 pH 5	A5 pH 5.5	A6 pH 6	A7 pH 7	A8 pH 8	A9 pH 8.5	A10 pH 9	A11 pH 9.5	A12 pH 10
B1 pH 4.5	B2 pH 4.5 + L-Alanine	B3 pH 4.5 + L-Arginine	B4 pH 4.5 + L-Asparagine	B5 pH 4.5 + L-Aspartic Acid	B6 pH 4.5 + L-Glutamic Acid	B7 pH 4.5 + L-Glutamine	B8 pH 4.5 + Glycine	B9 pH 4.5 + L-Isoleucine	B10 pH 4.5 + L-Isoleucine	B11 pH 4.5 + L-Leucine	B12 pH 4.5 + L-Leucine
C1 pH 4.5 + L-Methionine	C2 pH 4.5 + L-Phenylalanine	C3 pH 4.5 + L-Proline	C4 pH 4.5 + L-Serine	C5 pH 4.5 + L-Threonine	C6 pH 4.5 + L-Tryptophan	C7 pH 4.5 + L-Tyrosine	C8 pH 4.5 + L-Valine	C9 pH 4.5 + Hydroxy-L-Proline	C10 pH 4.5 + L-Ornithine	C11 pH 4.5 + L-Homoarginine	C12 pH 4.5 + L-Homoarginine
D1 pH 4.5 + Anthranic acid	D2 pH 4.5 + L-Norvaline	D3 pH 4.5 + L-Norvaline	D4 pH 4.5 + N-Amino-N-butyric acid	D5 pH 4.5 + S-Amino malonate	D6 pH 4.5 + β-Hydroxy Glutamate	D7 pH 4.5 + γ-Hydroxy Glutamate	D8 pH 4.5 + S-Hydroxy Lysine	D9 pH 4.5 + S-Hydroxy Tryptophan	D10 pH 4.5 + D,L-Ornithine pivalic acid	D11 pH 4.5 + Trimethyl amine-N-oxide	D12 pH 4.5 + Urea
E1 pH 5.5	E2 pH 5.5 + L-Alanine	E3 pH 5.5 + L-Arginine	E4 pH 5.5 + L-Asparagine	E5 pH 5.5 + L-Aspartic Acid	E6 pH 5.5 + L-Glutamic Acid	E7 pH 5.5 + L-Glutamine	E8 pH 5.5 + Glycine	E9 pH 5.5 + L-Isoleucine	E10 pH 5.5 + L-Isoleucine	E11 pH 5.5 + L-Leucine	E12 pH 5.5 + L-Leucine
F1 pH 5.5 + L-Isoleucine	F2 pH 5.5 + L-Phenylalanine	F3 pH 5.5 + L-Proline	F4 pH 5.5 + L-Serine	F5 pH 5.5 + L-Threonine	F6 pH 5.5 + L-Tryptophan	F7 pH 5.5 + L-Tyrosine	F8 pH 5.5 + L-Valine	F9 pH 5.5 + Hydroxy-L-Proline	F10 pH 5.5 + L-Ornithine	F11 pH 5.5 + L-Homoarginine	F12 pH 5.5 + L-Homoarginine
G1 pH 5.5 + Anthranic acid	G2 pH 5.5 + L-Norvaline	G3 pH 5.5 + L-Norvaline	G4 pH 5.5 + Agmatine	G5 pH 5.5 + Cadaverine	G6 pH 5.5 + Putrescine	G7 pH 5.5 + Putrescine	G8 pH 5.5 + Putrescine	G9 pH 5.5 + Phenylethylamine	G10 pH 5.5 + Tryptamine	G11 pH 5.5 + Trimethyl amine-N-oxide	G12 pH 5.5 + Urea
H1 X-Caprylate	H2 X-G-D-Glucoside	H3 X-G-D-Glucoside	H4 X-G-D-Galactoside	H5 X-G-D-Galactoside	H6 X-G-D-Glucuronide	H7 X-G-D-Glucuronide	H8 X-G-D-Glucuronide	H9 X-G-D-Glucosaminide	H10 X-G-D-Galactosaminide	H11 X-PO4	H12 X-PO4

Confidential

PM11C MicroPlate™

A1 Amikacin	A2 Amikacin	A3 Amikacin	A4 Amikacin	A5 Chlortetracycline	A6 Chlortetracycline	A7 Chlortetracycline	A8 Chlortetracycline	A9 Lincosyn	A10 Lincosyn	A11 Lincosyn	A12 Lincosyn
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Amoxicillin	B2 Amoxicillin	B3 Amoxicillin	B4 Amoxicillin	B5 Cloxacillin	B6 Cloxacillin	B7 Cloxacillin	B8 Cloxacillin	B9 Lomefloxacin	B10 Lomefloxacin	B11 Lomefloxacin	B12 Lomefloxacin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Bleomycin	C2 Bleomycin	C3 Bleomycin	C4 Bleomycin	C5 Colistin	C6 Colistin	C7 Colistin	C8 Colistin	C9 Mincycline	C10 Mincycline	C11 Mincycline	C12 Mincycline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Capromycin	D2 Capromycin	D3 Capromycin	D4 Capromycin	D5 Dermocycline	D6 Dermocycline	D7 Dermocycline	D8 Dermocycline	D9 Nalidixic acid	D10 Nalidixic acid	D11 Nalidixic acid	D12 Nalidixic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Cefazolin	E2 Cefazolin	E3 Cefazolin	E4 Cefazolin	E5 Enoxacin	E6 Enoxacin	E7 Enoxacin	E8 Enoxacin	E9 Nalidixic acid	E10 Nalidixic acid	E11 Nalidixic acid	E12 Nalidixic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Chloramphenicol	F2 Chloramphenicol	F3 Chloramphenicol	F4 Chloramphenicol	F5 Erythromycin	F6 Erythromycin	F7 Erythromycin	F8 Erythromycin	F9 Neomycin	F10 Neomycin	F11 Neomycin	F12 Neomycin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Ceftazoxime	G2 Ceftazoxime	G3 Ceftazoxime	G4 Ceftazoxime	G5 Gentamicin	G6 Gentamicin	G7 Gentamicin	G8 Gentamicin	G9 Potassium tellurite	G10 Potassium tellurite	G11 Potassium tellurite	G12 Potassium tellurite
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Cephalexin	H2 Cephalexin	H3 Cephalexin	H4 Cephalexin	H5 Kanamycin	H6 Kanamycin	H7 Kanamycin	H8 Kanamycin	H9 Ofloxacin	H10 Ofloxacin	H11 Ofloxacin	H12 Ofloxacin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM12B MicroPlate™

A1 Penicillin G	A2 Penicillin G	A3 Penicillin G	A4 Penicillin G	A5 Tetracycline	A6 Tetracycline	A7 Tetracycline	A8 Tetracycline	A9 Carbenicillin	A10 Carbenicillin	A11 Carbenicillin	A12 Carbenicillin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Oxacillin	B2 Oxacillin	B3 Oxacillin	B4 Oxacillin	B5 Pivmecillinam	B6 Pivmecillinam	B7 Pivmecillinam	B8 Pivmecillinam	B9 Polymyxin B	B10 Polymyxin B	B11 Polymyxin B	B12 Polymyxin B
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Paromomycin	C2 Paromomycin	C3 Paromomycin	C4 Paromomycin	C5 Vancomycin	C6 Vancomycin	C7 Vancomycin	C8 Vancomycin	C9 DL-Serine hydroxamate	C10 DL-Serine hydroxamate	C11 DL-Serine hydroxamate	C12 DL-Serine hydroxamate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Sisomicin	D2 Sisomicin	D3 Sisomicin	D4 Sisomicin	D5 Sulfamethoxazole	D6 Sulfamethoxazole	D7 Sulfamethoxazole	D8 Sulfamethoxazole	D9 Novobiocin	D10 Novobiocin	D11 Novobiocin	D12 Novobiocin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 2,4-Diamino-4,7-diazepropteridine	E2 2,4-Diamino-4,7-diazepropteridine	E3 2,4-Diamino-4,7-diazepropteridine	E4 2,4-Diamino-4,7-diazepropteridine	E5 Sulfadiazine	E6 Sulfadiazine	E7 Sulfadiazine	E8 Sulfadiazine	E9 Benzothiazolium chloride	E10 Benzothiazolium chloride	E11 Benzothiazolium chloride	E12 Benzothiazolium chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Tobramycin	F2 Tobramycin	F3 Tobramycin	F4 Tobramycin	F5 Sulfathiazole	F6 Sulfathiazole	F7 Sulfathiazole	F8 Sulfathiazole	F9 5-Fluorouracil	F10 5-Fluorouracil	F11 5-Fluorouracil	F12 5-Fluorouracil
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Spectinomycin	G2 Spectinomycin	G3 Spectinomycin	G4 Spectinomycin	G5 Sulfamethoxazole	G6 Sulfamethoxazole	G7 Sulfamethoxazole	G8 Sulfamethoxazole	G9 L-Aspartic acid	G10 L-Aspartic acid	G11 L-Aspartic acid	G12 L-Aspartic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Spiramycin	H2 Spiramycin	H3 Spiramycin	H4 Spiramycin	H5 Rifampicin	H6 Rifampicin	H7 Rifampicin	H8 Rifampicin	H9 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H10 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H11 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H12 Dodecyltrimethyl ammonium bromide
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM13B MicroPlate™

A1 Amphotillin	A2 Amphotillin	A3 Amphotillin	A4 Amphotillin	A5 Dequalinium chloride	A6 Dequalinium chloride	A7 Dequalinium chloride	A8 Dequalinium chloride	A9 Nickel chloride	A10 Nickel chloride	A11 Nickel chloride	A12 Nickel chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Azoxystrobin	B2 Azoxystrobin	B3 Azoxystrobin	B4 Azoxystrobin	B5 2, 2'-Dipyridyl	B6 2, 2'-Dipyridyl	B7 2, 2'-Dipyridyl	B8 2, 2'-Dipyridyl	B9 Oxalic acid	B10 Oxalic acid	B11 Oxalic acid	B12 Oxalic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 6-Mercapto-purine	C2 6-Mercapto-purine	C3 6-Mercapto-purine	C4 6-Mercapto-purine	C5 Doxycycline	C6 Doxycycline	C7 Doxycycline	C8 Doxycycline	C9 Potassium chromate	C10 Potassium chromate	C11 Potassium chromate	C12 Potassium chromate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Cefuroxime	D2 Cefuroxime	D3 Cefuroxime	D4 Cefuroxime	D5 5-Fluorouracil	D6 5-Fluorouracil	D7 5-Fluorouracil	D8 5-Fluorouracil	D9 Rofloxacillin	D10 Rofloxacillin	D11 Rofloxacillin	D12 Rofloxacillin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Cytosine-1-beta-D-arabino-furanoside	E2 Cytosine-1-beta-D-arabino-furanoside	E3 Cytosine-1-beta-D-arabino-furanoside	E4 Cytosine-1-beta-D-arabino-furanoside	E5 Geneticin (G418)	E6 Geneticin (G418)	E7 Geneticin (G418)	E8 Geneticin (G418)	E9 Ruthenium red	E10 Ruthenium red	E11 Ruthenium red	E12 Ruthenium red
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Cesium chloride	F2 Cesium chloride	F3 Cesium chloride	F4 Cesium chloride	F5 Glycine	F6 Glycine	F7 Glycine	F8 Glycine	F9 Thallium (I) acetate	F10 Thallium (I) acetate	F11 Thallium (I) acetate	F12 Thallium (I) acetate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Cobalt chloride	G2 Cobalt chloride	G3 Cobalt chloride	G4 Cobalt chloride	G5 Manganese chloride	G6 Manganese chloride	G7 Manganese chloride	G8 Manganese chloride	G9 Trifluoperazine	G10 Trifluoperazine	G11 Trifluoperazine	G12 Trifluoperazine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Cupric chloride	H2 Cupric chloride	H3 Cupric chloride	H4 Cupric chloride	H5 Moxalactam	H6 Moxalactam	H7 Moxalactam	H8 Moxalactam	H9 Tylosin	H10 Tylosin	H11 Tylosin	H12 Tylosin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM14A MicroPlate™

A1 Acetaminophen	A2 Acetaminophen	A3 Acetaminophen	A4 Acetaminophen	A5 Furazolidone	A6 Furazolidone	A7 Furazolidone	A8 Furazolidone	A9 Sanguinarine	A10 Sanguinarine	A11 Sanguinarine	A12 Sanguinarine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 9-Aminoacridine	B2 9-Aminoacridine	B3 9-Aminoacridine	B4 9-Aminoacridine	B5 Fusaric acid	B6 Fusaric acid	B7 Fusaric acid	B8 Fusaric acid	B9 Sodium arsenate	B10 Sodium arsenate	B11 Sodium arsenate	B12 Sodium arsenate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Boric Acid	C2 Boric Acid	C3 Boric Acid	C4 Boric Acid	C5 1-Hydroxy-pyridine-2-thione	C6 1-Hydroxy-pyridine-2-thione	C7 1-Hydroxy-pyridine-2-thione	C8 1-Hydroxy-pyridine-2-thione	C9 Sodium cyanate	C10 Sodium cyanate	C11 Sodium cyanate	C12 Sodium cyanate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Cadmium chloride	D2 Cadmium chloride	D3 Cadmium chloride	D4 Cadmium chloride	D5 Iodoacetate	D6 Iodoacetate	D7 Iodoacetate	D8 Iodoacetate	D9 Sodium dichromate	D10 Sodium dichromate	D11 Sodium dichromate	D12 Sodium dichromate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Cefoxitin	E2 Cefoxitin	E3 Cefoxitin	E4 Cefoxitin	E5 Nitrofurantoin	E6 Nitrofurantoin	E7 Nitrofurantoin	E8 Nitrofurantoin	E9 Sodium metaborate	E10 Sodium metaborate	E11 Sodium metaborate	E12 Sodium metaborate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Chloramphenicol	F2 Chloramphenicol	F3 Chloramphenicol	F4 Chloramphenicol	F5 Piperacillin	F6 Piperacillin	F7 Piperacillin	F8 Piperacillin	F9 Sodium metavanadate	F10 Sodium metavanadate	F11 Sodium metavanadate	F12 Sodium metavanadate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Chelerythrine	G2 Chelerythrine	G3 Chelerythrine	G4 Chelerythrine	G5 Carbenicillin	G6 Carbenicillin	G7 Carbenicillin	G8 Carbenicillin	G9 Sodium nitrite	G10 Sodium nitrite	G11 Sodium nitrite	G12 Sodium nitrite
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 EGTA	H2 EGTA	H3 EGTA	H4 EGTA	H5 Promethazine	H6 Promethazine	H7 Promethazine	H8 Promethazine	H9 Sodium orthovanadate	H10 Sodium orthovanadate	H11 Sodium orthovanadate	H12 Sodium orthovanadate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM15B MicroPlate™

A1 Procaine	A2 Procaine	A3 Procaine	A4 Procaine	A5 Guanidine hydrochloride	A6 Guanidine hydrochloride	A7 Guanidine hydrochloride	A8 Guanidine hydrochloride	A9 Cefmetazole	A10 Cefmetazole	A11 Cefmetazole	A12 Cefmetazole
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 D-Cycloserine	B2 D-Cycloserine	B3 D-Cycloserine	B4 D-Cycloserine	B5 EDTA	B6 EDTA	B7 EDTA	B8 EDTA	B9 5,7-Dichloro-8- hydroxy- quinoline	B10 5,7-Dichloro-8- hydroxy- quinoline	B11 5,7-Dichloro-8- hydroxy- quinoline	B12 5,7-Dichloro-8- hydroxy- quinoline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 5,7-Dichloro-8- hydroxyquinoline	C2 5,7-Dichloro-8- hydroxyquinoline	C3 5,7-Dichloro-8- hydroxyquinoline	C4 5,7-Dichloro-8- hydroxyquinoline	C5 Fusidic acid	C6 Fusidic acid	C7 Fusidic acid	C8 Fusidic acid	C9 1,18- Phenanthroline	C10 1,18- Phenanthroline	C11 1,18- Phenanthroline	C12 1,18- Phenanthroline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Phleomycin	D2 Phleomycin	D3 Phleomycin	D4 Phleomycin	D5 Domiphen bromide	D6 Domiphen bromide	D7 Domiphen bromide	D8 Domiphen bromide	D9 Nordihydroguai- resic acid	D10 Nordihydroguai- resic acid	D11 Nordihydroguai- resic acid	D12 Nordihydroguai- resic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Alicidina	E2 Alicidina	E3 Alicidina	E4 Alicidina	E5 5-Nitro-2- furaldehyde semicarbazone	E6 5-Nitro-2- furaldehyde semicarbazone	E7 5-Nitro-2- furaldehyde semicarbazone	E8 5-Nitro-2- furaldehyde semicarbazone	E9 Methyl viologen	E10 Methyl viologen	E11 Methyl viologen	E12 Methyl viologen
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 3,4-Dimethoxy- benzyl alcohol	F2 3,4-Dimethoxy- benzyl alcohol	F3 3,4-Dimethoxy- benzyl alcohol	F4 3,4-Dimethoxy- benzyl alcohol	F5 Oleandomycin	F6 Oleandomycin	F7 Oleandomycin	F8 Oleandomycin	F9 Purromycin	F10 Purromycin	F11 Purromycin	F12 Purromycin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 CCCP	G2 CCCP	G3 CCCP	G4 CCCP	G5 Sodium azide	G6 Sodium azide	G7 Sodium azide	G8 Sodium azide	G9 Menadione	G10 Menadione	G11 Menadione	G12 Menadione
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 2-Nitroimidazole	H2 2-Nitroimidazole	H3 2-Nitroimidazole	H4 2-Nitroimidazole	H5 Hydroxyurea	H6 Hydroxyurea	H7 Hydroxyurea	H8 Hydroxyurea	H9 Zinc chloride	H10 Zinc chloride	H11 Zinc chloride	H12 Zinc chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM16A MicroPlate™

A1 Cefotaxime	A2 Cefotaxime	A3 Cefotaxime	A4 Cefotaxime	A5 Phosphomycin	A6 Phosphomycin	A7 Phosphomycin	A8 Phosphomycin	A9 5-Chloro-7-iodo- 8-hydroxy- quinoline	A10 5-Chloro-7-iodo- 8-hydroxy- quinoline	A11 5-Chloro-7-iodo- 8-hydroxy- quinoline	A12 5-Chloro-7-iodo- 8-hydroxy- quinoline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Norfloxacin	B2 Norfloxacin	B3 Norfloxacin	B4 Norfloxacin	B5 Sulfanilamide	B6 Sulfanilamide	B7 Sulfanilamide	B8 Sulfanilamide	B9 Trimethoprim	B10 Trimethoprim	B11 Trimethoprim	B12 Trimethoprim
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Dienelutamide	C2 Dienelutamide	C3 Dienelutamide	C4 Dienelutamide	C5 Protamine sulfate	C6 Protamine sulfate	C7 Protamine sulfate	C8 Protamine sulfate	C9 Cetylpyridinium chloride	C10 Cetylpyridinium chloride	C11 Cetylpyridinium chloride	C12 Cetylpyridinium chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 1-Chloro-2,4- dinitrobenzene	D2 1-Chloro-2,4- dinitrobenzene	D3 1-Chloro-2,4- dinitrobenzene	D4 1-Chloro-2,4- dinitrobenzene	D5 Diamide	D6 Diamide	D7 Diamide	D8 Diamide	D9 Cinoxacin	D10 Cinoxacin	D11 Cinoxacin	D12 Cinoxacin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Streptomycin	E2 Streptomycin	E3 Streptomycin	E4 Streptomycin	E5 S-Azacytidine	E6 S-Azacytidine	E7 S-Azacytidine	E8 S-Azacytidine	E9 Rifamycin SV	E10 Rifamycin SV	E11 Rifamycin SV	E12 Rifamycin SV
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Potassium tellurite	F2 Potassium tellurite	F3 Potassium tellurite	F4 Potassium tellurite	F5 Sodium selenite	F6 Sodium selenite	F7 Sodium selenite	F8 Sodium selenite	F9 Aluminum sulfate	F10 Aluminum sulfate	F11 Aluminum sulfate	F12 Aluminum sulfate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Chromium chloride	G2 Chromium chloride	G3 Chromium chloride	G4 Chromium chloride	G5 Ferric chloride	G6 Ferric chloride	G7 Ferric chloride	G8 Ferric chloride	G9 L-Glutamic-g- hydroxamate	G10 L-Glutamic-g- hydroxamate	G11 L-Glutamic-g- hydroxamate	G12 L-Glutamic-g- hydroxamate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Glycine hydroxamate	H2 Glycine hydroxamate	H3 Glycine hydroxamate	H4 Glycine hydroxamate	H5 Chloroxylenol	H6 Chloroxylenol	H7 Chloroxylenol	H8 Chloroxylenol	H9 Sorbic acid	H10 Sorbic acid	H11 Sorbic acid	H12 Sorbic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM17A MicroPlate™

A1 D-Serine	A2 D-Serine	A3 D-Serine	A4 D-Serine	A5 β-Chloro-L-alanine hydrochloride	A6 β-Chloro-L-alanine hydrochloride	A7 β-Chloro-L-alanine hydrochloride	A8 β-Chloro-L-alanine hydrochloride	A9 Thioalloyic acid	A10 Thioalloyic acid	A11 Thioalloyic acid	A12 Thioalloyic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Sodium salicylate	B2 Sodium salicylate	B3 Sodium salicylate	B4 Sodium salicylate	B5 Hygromycin B	B6 Hygromycin B	B7 Hygromycin B	B8 Hygromycin B	B9 Ethinamide	B10 Ethinamide	B11 Ethinamide	B12 Ethinamide
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 4-Aminopyridine	C2 4-Aminopyridine	C3 4-Aminopyridine	C4 4-Aminopyridine	C5 Sulfachloropyridazine	C6 Sulfachloropyridazine	C7 Sulfachloropyridazine	C8 Sulfachloropyridazine	C9 Sulfamonomethoxine	C10 Sulfamonomethoxine	C11 Sulfamonomethoxine	C12 Sulfamonomethoxine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Oxycarboxin	D2 Oxycarboxin	D3 Oxycarboxin	D4 Oxycarboxin	D5 3-Amino-1,2,4-triazole	D6 3-Amino-1,2,4-triazole	D7 3-Amino-1,2,4-triazole	D8 3-Amino-1,2,4-triazole	D9 Chlorpromazine	D10 Chlorpromazine	D11 Chlorpromazine	D12 Chlorpromazine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Naproxen	E2 Naproxen	E3 Naproxen	E4 Naproxen	E5 Compound 48/80	E6 Compound 48/80	E7 Compound 48/80	E8 Compound 48/80	E9 Sodium tungstate	E10 Sodium tungstate	E11 Sodium tungstate	E12 Sodium tungstate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Lithium chloride	F2 Lithium chloride	F3 Lithium chloride	F4 Lithium chloride	F5 DL-Methionine hydroxamate	F6 DL-Methionine hydroxamate	F7 DL-Methionine hydroxamate	F8 DL-Methionine hydroxamate	F9 Tannic acid	F10 Tannic acid	F11 Tannic acid	F12 Tannic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Chlorambucil	G2 Chlorambucil	G3 Chlorambucil	G4 Chlorambucil	G5 Cefamandole nafate	G6 Cefamandole nafate	G7 Cefamandole nafate	G8 Cefamandole nafate	G9 Cefoperazone	G10 Cefoperazone	G11 Cefoperazone	G12 Cefoperazone
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Cefuroxime	H2 Cefuroxime	H3 Cefuroxime	H4 Cefuroxime	H5 Caffeine	H6 Caffeine	H7 Caffeine	H8 Caffeine	H9 Phenylarsine oxide	H10 Phenylarsine oxide	H11 Phenylarsine oxide	H12 Phenylarsine oxide
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM18C MicroPlate™

A1 Ketoprofen	A2 Ketoprofen	A3 Ketoprofen	A4 Ketoprofen	A5 Sodium pyrophosphate decahydrate	A6 Sodium pyrophosphate decahydrate	A7 Sodium pyrophosphate decahydrate	A8 Sodium pyrophosphate decahydrate	A9 Thiamphenicol	A10 Thiamphenicol	A11 Thiamphenicol	A12 Thiamphenicol
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Trifluoromethine	B2 Trifluoromethine	B3 Trifluoromethine	B4 Trifluoromethine	B5 Pipemidic Acid	B6 Pipemidic Acid	B7 Pipemidic Acid	B8 Pipemidic Acid	B9 Azathioprine	B10 Azathioprine	B11 Azathioprine	B12 Azathioprine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Poly-L-lysine	C2 Poly-L-lysine	C3 Poly-L-lysine	C4 Poly-L-lysine	C5 Sulfonazole	C6 Sulfonazole	C7 Sulfonazole	C8 Sulfonazole	C9 Pentachlorophenol	C10 Pentachlorophenol	C11 Pentachlorophenol	C12 Pentachlorophenol
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Sodium m-arsenite	D2 Sodium m-arsenite	D3 Sodium m-arsenite	D4 Sodium m-arsenite	D5 Sodium bromate	D6 Sodium bromate	D7 Sodium bromate	D8 Sodium bromate	D9 Lidocaine	D10 Lidocaine	D11 Lidocaine	D12 Lidocaine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Sodium metasilicate	E2 Sodium metasilicate	E3 Sodium metasilicate	E4 Sodium metasilicate	E5 Sodium m-periodate	E6 Sodium m-periodate	E7 Sodium m-periodate	E8 Sodium m-periodate	E9 Antimony (III) chloride	E10 Antimony (III) chloride	E11 Antimony (III) chloride	E12 Antimony (III) chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Semicarbazide	F2 Semicarbazide	F3 Semicarbazide	F4 Semicarbazide	F5 Thiazole	F6 Thiazole	F7 Thiazole	F8 Thiazole	F9 Aztreonam	F10 Aztreonam	F11 Aztreonam	F12 Aztreonam
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Triclosan	G2 Triclosan	G3 Triclosan	G4 Triclosan	G5 3,5-Diamino-1,2,4-triazole (Guarazole)	G6 3,5-Diamino-1,2,4-triazole (Guarazole)	G7 3,5-Diamino-1,2,4-triazole (Guarazole)	G8 3,5-Diamino-1,2,4-triazole (Guarazole)	G9 Myricetin	G10 Myricetin	G11 Myricetin	G12 Myricetin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 5-Fluoro-5'-deoxyuridine	H2 5-Fluoro-5'-deoxyuridine	H3 5-Fluoro-5'-deoxyuridine	H4 5-Fluoro-5'-deoxyuridine	H5 2-Phenylphenol	H6 2-Phenylphenol	H7 2-Phenylphenol	H8 2-Phenylphenol	H9 Plumbagin	H10 Plumbagin	H11 Plumbagin	H12 Plumbagin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM19 MicroPlate™

A1 Joamycin	A2 Joamycin	A3 Joamycin	A4 Joamycin	A5 Gallic acid	A6 Gallic acid	A7 Gallic acid	A8 Gallic acid	A9 Coumarin	A10 Coumarin	A11 Coumarin	A12 Coumarin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Methylthioctyl- ammonium chloride	B2 Methylthioctyl- ammonium chloride	B3 Methylthioctyl- ammonium chloride	B4 Methylthioctyl- ammonium chloride	B5 Harmaline	B6 Harmaline	B7 Harmaline	B8 Harmaline	B9 2,4-Dinitrophenol	B10 2,4-Dinitrophenol	B11 2,4-Dinitrophenol	B12 2,4-Dinitrophenol
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Chlorhexidine	C2 Chlorhexidine	C3 Chlorhexidine	C4 Chlorhexidine	C5 Umbelliferone	C6 Umbelliferone	C7 Umbelliferone	C8 Umbelliferone	C9 Cinnamic acid	C10 Cinnamic acid	C11 Cinnamic acid	C12 Cinnamic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Diethylthram	D2 Diethylthram	D3 Diethylthram	D4 Diethylthram	D5 Iodotetro Tetrazolium Violet	D6 Iodotetro Tetrazolium Violet	D7 Iodotetro Tetrazolium Violet	D8 Iodotetro Tetrazolium Violet	D9 Phenyl- methyl- sulfonate (PMSF)	D10 Phenyl- methyl- sulfonate (PMSF)	D11 Phenyl- methyl- sulfonate (PMSF)	D12 Phenyl- methyl- sulfonate (PMSF)
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 FCCP	E2 FCCP	E3 FCCP	E4 FCCP	E5 D,L-Thiolic Acid	E6 D,L-Thiolic Acid	E7 D,L-Thiolic Acid	E8 D,L-Thiolic Acid	E9 Lawsons	E10 Lawsons	E11 Lawsons	E12 Lawsons
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Phenethylamine	F2 Phenethylamine	F3 Phenethylamine	F4 Phenethylamine	F5 Benzalkid 3	F6 Benzalkid 3	F7 Benzalkid 3	F8 Benzalkid 3	F9 Sodium caprylate	F10 Sodium caprylate	F11 Sodium caprylate	F12 Sodium caprylate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Lauryl sulfobetaine	G2 Lauryl sulfobetaine	G3 Lauryl sulfobetaine	G4 Lauryl sulfobetaine	G5 Dihydro- stryptomycin	G6 Dihydro- stryptomycin	G7 Dihydro- stryptomycin	G8 Dihydro- stryptomycin	G9 Hydroxylamine	G10 Hydroxylamine	G11 Hydroxylamine	G12 Hydroxylamine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Hexamine cobalt (III) chloride	H2 Hexamine cobalt (III) chloride	H3 Hexamine cobalt (III) chloride	H4 Hexamine cobalt (III) chloride	H5 Thioglycerol	H6 Thioglycerol	H7 Thioglycerol	H8 Thioglycerol	H9 Polymyxin B	H10 Polymyxin B	H11 Polymyxin B	H12 Polymyxin B
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM20B MicroPlate™

A1 Amitriptyline	A2 Amitriptyline	A3 Amitriptyline	A4 Amitriptyline	A5 Apramycin	A6 Apramycin	A7 Apramycin	A8 Apramycin	A9 Benzocaine	A10 Benzocaine	A11 Benzocaine	A12 Benzocaine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Orphenadrine	B2 Orphenadrine	B3 Orphenadrine	B4 Orphenadrine	B5 D,L-Propranolol	B6 D,L-Propranolol	B7 D,L-Propranolol	B8 D,L-Propranolol	B9 Tetrazolium violet	B10 Tetrazolium violet	B11 Tetrazolium violet	B12 Tetrazolium violet
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Thioridazine	C2 Thioridazine	C3 Thioridazine	C4 Thioridazine	C5 Atropine	C6 Atropine	C7 Atropine	C8 Atropine	C9 Ornidazole	C10 Ornidazole	C11 Ornidazole	C12 Ornidazole
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Proflavine	D2 Proflavine	D3 Proflavine	D4 Proflavine	D5 Ciprofloxacin	D6 Ciprofloxacin	D7 Ciprofloxacin	D8 Ciprofloxacin	D9 18-Crown-6 ether	D10 18-Crown-6 ether	D11 18-Crown-6 ether	D12 18-Crown-6 ether
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Crystal violet	E2 Crystal violet	E3 Crystal violet	E4 Crystal violet	E5 Dodecane	E6 Dodecane	E7 Dodecane	E8 Dodecane	E9 Hexa- chlorophane	E10 Hexa- chlorophane	E11 Hexa- chlorophane	E12 Hexa- chlorophane
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 4-Hydroxy- coumarin	F2 4-Hydroxy- coumarin	F3 4-Hydroxy- coumarin	F4 4-Hydroxy- coumarin	F5 Oxyltetraacycline	F6 Oxyltetraacycline	F7 Oxyltetraacycline	F8 Oxyltetraacycline	F9 Pridinol	F10 Pridinol	F11 Pridinol	F12 Pridinol
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Caplan	G2 Caplan	G3 Caplan	G4 Caplan	G5 3,5-Dinitro- benzene	G6 3,5-Dinitro- benzene	G7 3,5-Dinitro- benzene	G8 3,5-Dinitro- benzene	G9 8-Hydroxy- quinoline	G10 8-Hydroxy- quinoline	G11 8-Hydroxy- quinoline	G12 8-Hydroxy- quinoline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Patulin	H2 Patulin	H3 Patulin	H4 Patulin	H5 Tolyfluorid	H6 Tolyfluorid	H7 Tolyfluorid	H8 Tolyfluorid	H9 Troleandomycin	H10 Troleandomycin	H11 Troleandomycin	H12 Troleandomycin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4