

E-cell system を用いた酵母菌のグルカン合成に関するモデル構築

鎌田真由美, 仲嶋なつ, 石川千里, 高田雅美, 城和貴
奈良女子大学 理学部 情報科学科

概要

清酒醸造工程では, 特有の製法で高濃度アルコールが生成される. 清酒の発酵を行う酵母菌には, アルコール耐性を持つものが適しており, そのような酵母菌を発見するために現在様々な研究や実験が行われている. その中で, 酵母菌のアルコール耐性については, 遺伝子レベルで徐々に明らかになってきている. しかしながら, 実際の酵母菌を用いた実験には, 多くのコストを必要とする. そこで, アルコール耐性に関するシミュレーションモデルを構築し, アルコール耐性に関する新たな知見の獲得を試みる. 本稿では, まず細胞壁の主成分であるグルカンに着目し, 汎用細胞シミュレーションソフトである E-Cell System を用いて, 1,3-β グルカン合成に関する簡潔な代謝経路についてモデル構築を行う.

A Simulation Model for Connected Glucan Synthesis of Yeast for the E-Cell System

Mayumi Kamada, Nakajima Natsu, Ishikawa Chisato, Takata Masami, Joe Kazuki
Department of Information and Computer Science,
Nara Women's University

Abstract

Brewing of sake generates high concentration of ethanol, so we need to obtain yeast with the ethanol tolerance property. There have been a lot of research experiments to find such yeast. Recently, it turned out that how yeast cells response to ethanol on a gene level. The gene level experiments require huge cost and time, so we try to model the response mechanism of yeast cells to ethanol for computer simulation. In This paper, we model a simple metabolism of 1,3-b-glucan synthesis using the E-cell system.

1. はじめに

日本では古来より酒造りが盛んに行われている. 酒造りでは, 酵母菌によって米などの糖質をアルコール発酵させる. 酵母菌によるアルコール発酵と, その副産物である香味成分などが, それぞれの酒の風味を決めることになる[1]. 清酒の個性は, 酵母菌の特性による物が多く, 様々な酵母

菌の培養が試みられている. その様々な酵母菌の一つに, 花から抽出した酵母菌である花酵母と言うものがある. 花酵母は, 東京農業大学の中田が, 世界で始めて分離し誕生させたものである. 現在花酵母は10種類ほど存在し, この特殊な酵母を使った清酒は香り高く, しっかりとした味を表現できるといわれている[2]. まさに個性的な清酒

作りに適した酵母菌であると考えられる。本学においても、花酵母の研究の一環として、現在生物科学科が、奈良の天然記念物であり、本キャンパス内にも生育している「奈良の八重桜」より酵母菌の抽出を試みている。

清酒の醸造では、デンプンの糖化と酵母による発酵が同時に行われる並列複醗酵という独特の製造法が用いられる。この独特の製造法により生成されるアルコールの濃度は、20%近くに達する。よって清酒醸造において酵母菌は、常に高いアルコール濃度下での増殖を強いられ、アルコール濃度に耐えられない酵母菌は死滅する。このため清酒醸造においては、高いアルコール濃度において死滅しにくい酵母菌、つまり高いアルコール耐性を持つ酵母菌が必要とされる。

本学生物科学科が現在抽出を行っている酵母菌は、まだ培養段階で弱く、清酒の醸造に用いることが可能か不明である。また酵母菌の培養には時間を要し、そこから得られる酵母菌を用いた試行錯誤的な実験には様々な労力が必要になる。そこで、酵母菌のアルコール耐性についてモデル構築を行い、それをを用いて計算機上で酵母菌の振る舞いをシミュレートすることで、アルコール耐性を持つ酵母菌の効率の良い取得に貢献できると考える。本研究では、文献の実験データなどから、アルコール耐性に関する代謝経路や、遺伝子発現機構のシミュレーションモデルの構築を行い、モデルに対してまずは清酒醸造にもちいられる協会 7 号などの高いアルコール耐性を持つとされる酵母菌のデータを与えてシミュレーションを行う。シミュレーション後、本学生物科学科が抽出している酵母菌から取得可能なデータを与え、比較し醸造に対して有効な知見を得る事を試みる。

本稿ではシミュレーションモデルの一部として、アルコール耐性と関連のある 1,3-β グルカンの

合成に関わる代謝経路のモデルを構築する。

以下、2 章にてアルコール耐性について述べ、3 章においてモデル構築に付いて述べる。4 章では構築した簡単なモデルの E-cell system による実行結果について説明し、5 章でモデルの改良に関する考察を行う。

2. アルコール耐性酵母菌

酵母菌のアルコール耐性については、対浸透圧耐性や温度耐性に比べ不明な点が多かったが、最近の研究で様々なことが解明されている。

下飯の実験によって、アルコール耐性を持つ酵母菌でのみ高発現している遺伝子が、いくつか存在することが確認された[3]。これらの遺伝子には、様々な環境ストレスの存在下でのみ発現し、通常は発現しない遺伝子が含まれていることがわかった。これらの遺伝子は、それぞれ、浸透圧ストレス・酸化ストレス・熱ショックに関与しているとされる遺伝子である。いずれもプロモーター領域に STRE(stress response element)配列を持っており、高温やエタノールの存在を含めた様々な環境ストレスによって誘発することが知られている。

また同実験において、アルコール耐性酵母は細胞壁溶解酵素耐性も持つことから、細胞壁の強度とエタノール耐性についての関係も指摘されており、細胞壁合成に関係する Pkc1-MAPK カスケードを活性化する遺伝子 Rho1 との関係も示唆されている。

・ 酵母菌の細胞壁

酵母菌の細胞壁における主な構成成分は、マンノプロテイン・グルカン・キチンである。中でもグルカンは、細胞壁の乾燥重量の約 55 - 65%を占めている。構成要素であるグルカンには、グルコースが 1,3 結合した 1,3-β

グルカンと、1,6 結合した 1,6- β グルカンが存在するが、1,3- β グルカンが細胞壁におけるグルカンの約 80%を占める[4]. 細胞壁の弾力性は個々の 1,3 β グルカン分子の構造を反映しており[5], 細胞壁の強度は主に 1,3- β グルカンによるといえる[6][7]. 1,3- β グルカンの合成は細胞壁形成のモデルとしても用いられている.

• Pkc1-MAPK カスケード

MAPK カスケードは、細胞の増殖や分化などを制御する細胞統合性経路で、細胞壁に対する様々なストレスのシグナル伝達を行う。ストレスなどのシグナルは、タンパク質を連鎖的にリン酸化することで下流へ伝えられる[8]. MAPK カスケードを制御している Pkc1 は、細胞表面センサータンパク質である Rho1 によって活性化される[9]. MAPK カスケードを介したシグナル伝達は、1,3- β グルカンの合成酵素の触媒サブユニットをエンコードする遺伝子である Fks2 の転写活性化を引き起こす事もわかっている[10].

• Rho1 遺伝子

Rho1 は、細胞極性の形成やアクチン骨格の再構成、1,3- β グルカン合成酵素や Pkc1-MAPK カスケードの活性化に関係しており、酵母菌の形成維持においてとても重要な遺伝子である。また、細胞壁センサーといわれている Mid2 と Wsc1 が Rho1 へストレスのシグナルを渡し、Pkc1-MAPK カスケードの活性化を起こすと考えられている。

以上のことから、現段階での最終的なモデルの構造として次のような流れを考える。図 1 に流れの概要を示す。

- ① 細胞壁へのエタノールストレスを細胞壁のセンサーである Mid2 または Wsc1 が感知する。
- ② 感知したシグナルが Rho1, Pkc1-MAPK 経路を介して伝えられる。
- ③ 伝えられたシグナルによって 1,3 β グルカン合成酵素の誘発が起こり 1,3- β グルカン合成を中心とした細胞壁合成の促進につながっていく

実際酵母菌において、エタノールのストレスシグナルを受け取る遺伝子は複数あると考えられている。関連が疑われる遺伝子が発見された場合、受け取り遺伝子の追加などで対応することを考えている。

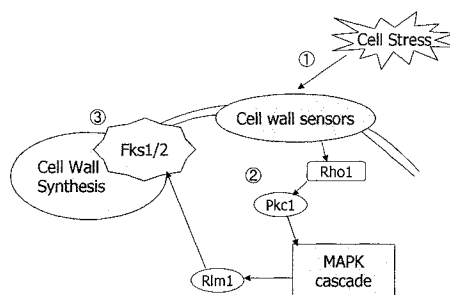


図 1.モデルのイメージ

3. モデル

本稿ではまず、MAPK カスケードからシグナルを受け取る Fks1 と、Fks2 によって活性化される 1,3- β グルカン合成について着目しモデル構築を試みる。

3.1 代謝経路

1,3- β グルカンの合成に関する代謝経路は pathway データベース KEGG[11]を参考にし、本稿では最低限必要と思われる要素のみの系を考える。図2に本稿での代謝経路を示す。要素と反応についてはそれぞれ表 1 と表 2 に示す。

これらの反応は酵母菌の生体内において細胞

膜状や細胞質など様々な場所で行われるため、それぞれに空間的な考慮が必要となると考えられるが、今回は細胞質内ですべての反応が起こると仮定する。

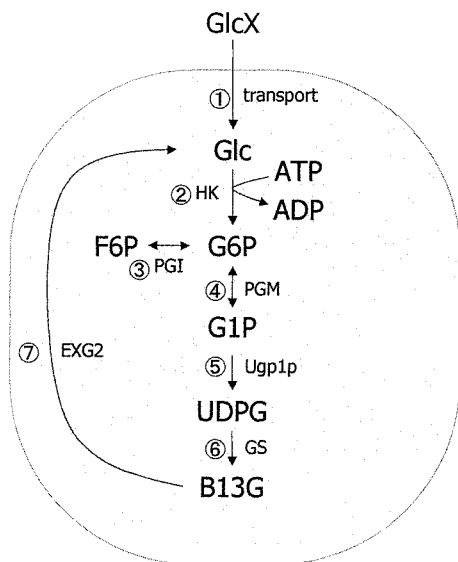


図 2. 本稿でのグルカン合成の代謝経路

表 1. 反応における要素とその略語

Abbreviation	Appellation
< Metabolite >	
GlcX	Extracellular Glucose
Glc	α -D-Glucose
G6P	α -D-Glucose 6-phosphate
F6P	β -D-Fructose 6-phosphate
G1P	α -D-Glucose 1-phosphate
UTP	UTP
UDPG	UDP-Glucose
B13G	1,3- β -Glucan
PP	Diphosphate
< Enzyme >	
HK	Hexokinase
PGI	glucose-6-phosphate isomerase
PGM	phosphoglucomutase
Ugp1p	UTP-Glucose-1-phosphate uridylyltransferase
GS	1,3- β -glucan synthase
EXG2	glucan 1,3- β -glucosidase

表 2. 各々の反応

反応	
① transport	$GlcX \rightleftharpoons Glc$
② HK	$Glc + ATP \Rightarrow G6P + ADP$
③ PGI	$G6P \rightleftharpoons F6P$
④ PGM	$G6P \rightleftharpoons G1P$
⑤ Ugp1p	$G1P + UTP \rightleftharpoons UDPG + PP$
⑥ GS	$UDPG \Rightarrow B13G$
⑦ EXG2	$B13G \Rightarrow Glc$

3.1.2 反応速度式

酵素反応などの化学反応の数学的な記述方法は複数あるが、古くから一般的に用いられているのは微分方程式によるものである。本稿でもこの微分方程式による表現を採用する。いずれかの文献内で、反応速度式が提唱されている反応に関してはその反応速度式を用いる。その他の反応に関しては Michaelis-Menten 式とその拡張式を用いた。反応式は各々表 4 に示す。

3.1.3 パラメータ

各反応式におけるパラメータは、既存の文献の実験データ、酵素の反応定数データベース BRENDA[16]などから引用したものを用いる表 3 にそれぞれの反応式におけるパラメータを示す。本稿ではパラメータの設定にあたり、まず以下のような条件に合うものを文献などで調査した。

- ・ 実験の条件が pH7.4-8 の間
- ・ 生物種:酵母菌

この条件を満たす酵母菌のパラメータデータが見つからない場合は、ウサギの筋肉における酵素活性の文献データを用いる。これは運動時のウサギの筋肉における酵素の活性は酵母菌と良く似ていると言われているためである。

⑥GSと⑦EXG2の反応はE-CellSystemに既存の MichalisUniUniProcessClass を用いるので $Kcat(1/sec)$ と $Km(M)$ を与えている。計算後の値は"個数/sec"になる。その他の反応における $Vm(mM/min)$, $Km(mM)$ でそろえ、計算後の値を"個数/sec"になるようにモデルファイルに記述している。

表 3.反応式におけるパラメータ

反応	Parameter	model	
Transport	Vm	17.203	
	KGlc	1.1	
	K1G6P	1.76	
	K2G6P	7.5	
	P	1.0	
HK	Vm	51.750	[15][25]
	KATP	0.10	
	KGlc	0.13	
	KdGlc	0.37	
PGI	Vm	496.04	[16][15]
	KmG6P	0.8	
	KmF6P	0.15	
	Keq	0.2	
PGM	Vm1	11.274	[26]
	Vm6	3.5935	
	KmG1P	0.0154	
	KmG6P	0.057	
	Keq	1.78	
Ugplp	Vm	1.002	[27]
	KmUTP	0.24	
	KmG1P	0.19	
	KmUDP	0.40	
	Keq	0.15	
GS	Kcat	0.1048	[28]
	Km	0.00037	
EXG2	Kcat	1.2936	[16]
	Km	0.000407	

3.4 E-Cell System

本稿で用いたE-Cell Systemは、慶應義塾大学の富田教授らによるE-Cellプロジェクトによって開発されたオープンソースの汎用細胞シミュレーターである。E-CellSystemは独自のモデル記述言語によりモデル構築を行う。今回はE-Cell Version 3.1.105を用いてモデルの記述を行った。

4 実行結果

本稿で1,3βグルカン合成について考えた系は閉鎖的な代謝経路であるから実行結果としては基質やエネルギーの一方的な減少と、生成物の

増加と減少の流れがシミュレートできると予想される。図3は実際にモデルを30000秒動かしたときの1,3βグルカンの分子量の変化である。合成と分解による分子量の上昇と下降が見られる。[14][24][15]他の要素に関しても同様に本稿での系にふさわしい挙動が見られた。

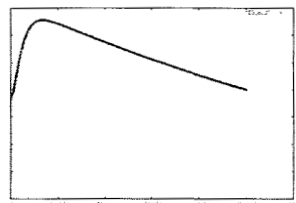


図 3. 1,3-βグルカン

(縦軸はグルカン分子量, 横軸は時間(s))

また、本稿で作成したモデルの反応式には阻害を加味してあるものがあるが、①Transportの反応では細胞質内のG6Pによる阻害を考慮している。そこでG6Pの分子量を10倍ずつを変化させモデルを30000秒実行させた。図4はその出力結果である。

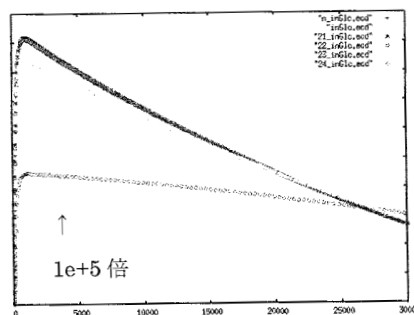


図 4. G6Pによるグルコースの取り込み阻害

図4の縦軸はグルコースの分子量、横軸が時間(s)を表している。G6Pの分子数の変化が1e+3倍までは特に変化が見られないが、1e+4倍から少し変化が見られ、1e+5倍に関してはグルコースの分子数量が半減しているのが見られる。それぞれの基質の量的な関係を見ると、G6Pの分子量を1e+5倍したときにはじめて外部のグルコースの分子量よりも大きくなっていった。

表 4. モデルの反応式

反応	反応式	Refs.
1	$\bar{v} = \frac{V_{max} \frac{[GlcX]}{K_{Glc}}}{I + \frac{[GlcX]}{K_{Glc}} + \frac{P \frac{[GlcX]}{K_{Glc}} + 1}{P \frac{[GlcX]}{K_{Glc}} + 1} \left(1 + \frac{[Glc]}{K_{Glc}} + \frac{[G6P]}{K_{G6P}} + \frac{[Glc]}{K_{Glc}} \frac{[G6P]}{K_{G6P}} \right)}$	[14]
2	$\bar{v} = \frac{V_{max} \frac{[Glc]}{K}}{I + \frac{[Glc]}{K_{Glc}} + \frac{P \frac{[Glc]}{K_{Glc}} + 1}{P \frac{[GlcX]}{K_{Glc}} + 1} \left(1 + \frac{[Glc]}{K_{Glc}} \right) + \frac{[G6P]}{K_{G6P}} + \frac{[Glc]}{K_{Glc}} \frac{[G6P]}{K_{G6P}}}$	[15][23]
3, 4	$\bar{v} = \frac{K_{cat} [E][S]}{K_{ms} + [S] + \frac{K_{ms}}{K_{mp}} [P]}$	[12]
5	$\bar{v} = \frac{V_{max} \frac{[P]}{K_{mp}}}{K_{ms} + [S] + \frac{K_{ms}}{K_{mp}} [P]}$	[12]
6, 7	$\bar{v} = \frac{V_{max} \frac{[SO][S1]}{K_{msSO} K_{msS1}}}{K_{msSO} K_{msS1} \left(1 + \frac{[SO]}{K_{msSO}} + \frac{[P0]}{K_{mP0}} \right) \left(1 + \frac{[S1]}{K_{msS1}} + \frac{[P1]}{K_{mP1}} \right)}$	[13]
	$\bar{v} = \frac{V_{max} \frac{[P0][P1]}{K_{eq}}}{K_{msSO} K_{msS1} \left(1 + \frac{[SO]}{K_{msSO}} + \frac{[P0]}{K_{mP0}} \right) \left(1 + \frac{[S1]}{K_{msS1}} + \frac{[P1]}{K_{mP1}} \right)}$	[13]
	$v = \frac{K_{cat} [E][S]}{K_m + [S]}$	

5 改良項目

5.1 速度式

本稿では化学反応の反応速度表現に微分微分方程式を採用し、ほぼすべてのプロセスを基本的な酵素反応速度式である Michaelis-Menten の式で表したが、今回取り上げた酵母菌のグルカン合成は主に細胞膜上で行われる。また、1,3-βグルカン合成の際 Fks2 が細胞膜上を移動することがわかっており、この運動が 1,3-βグルカン合成を行う際に必要であると考えられている。よって今回取り上げた系は、空間座標に依存すると考えられ、速度式は拡散項と反応項を含む連立偏微分方程式の形で表現するのがより適しているのではないかと考える。

5.2 パラメータ

本稿において速度式に用いたパラメータはすべて主に文献に記載されているデータをもとに選択した。今後、本学生物科学科の協力を得、まずは清酒の酵母である協会 7 号のデータによってパラメータの設定・調節を行い、シミュレーション結果との比較を実際に行って行きたいと考えている。

5.3 1,3-βグルカン合成酵素調節機構

2 章で述べたとおり、グルカンは酵母菌の細胞壁を構成する主要な要素として重要な役割を担っている。1,3-βグルカン合成酵素(GS)は、細胞膜上に存在する酵素複合体でありUDP-glucoseからグルカン鎖へのグルコース転移を触媒する。GS複合体は活性に必要な不可欠な触媒サブユニットと制御サブユニットを持つ[16]。触媒サブユニットは2つの相同遺伝子 Fks1 と Fks2 によって

エンコードされるタンパク質 Fks1p1 と Fks2p に、制御サブユニットは Rho1 によってエンコードされる GTP 結合タンパク質によって構成されている。

Fks1 遺伝子の欠失は β グルカンの減少を引き起こし、キチンやマンノプロテインのレベルを増加させる。一方 Fks2 遺伝子の欠失は細胞壁に明白な異常を生じさせない[17]。この 2 つの遺伝子は異なった発現の仕方を見せる。Fks1 はグルコースの存在する栄養増殖の間に発現するが、増殖条件下において Fks2 の転写は殆ど検知することができない。しかしグルコースの枯渇した状況下においては Fks2 の発現をみることが出来る[18]。この 2 つの変異体は合成致死を引き起こし、Fks1 の欠失は Fks2 の発現を誘発する[19]。つまり Fks1 と Fks2 は状況に応じて使い分けられ、補い合っていると考えられる。この事からも 1,3 β グルカンがいかに酵母菌にとって必要不可欠なものかが伺える。

Fks2 が発現するのは貧グルコース下で、酵母菌にとってはグルコースが枯渇し反応が止まってしまうと生命自体の危機である。そのときに普段は発現を見ることが出来ない Fks2 の発現率が高まるということは、グルコースとの親和性が Fks2 のほうが Fks1 よりも高いと考えられる。この 2 つの遺伝子によってエンコードされる酵素を GS1 と GS2 とすると、GS1 と GS2 はグルコースをアロステリックエフェクターとするアロステリック酵素といえる。この活性を見た時に、興味深いシグモイド曲線を見ることが出来るのではないかと考え現在 GS を GS1 と GS2 とし、それぞれに異なる反応式・パラメータを与えたモデルの構築を行っている。

5.4 遺伝子的な GS の制御

調節サブユニット Fks1, Fks2 のそれぞれについての遺伝子的な調節もわかってきている。Fks2 の活性に対して正の制御を与える遺伝子として Rlm1 と Rho1 があげられる。Rlm1 は MAPK カスケードのシグナルの末端部にあたる遺伝子で、MAPK カスケードからの細胞壁合成促進のシグナルはこの遺伝子から Fks2 などを通して行われると考えられている。

逆に負の制御を与える遺伝子として Smk1[20]がある。この遺伝子も MAPK カスケードの中の一遺伝子である。GS の活性は複雑な調

整ネットワークによって制御されている。このような遺伝子的調節ネットワークを含めたモデル構築を最終的に行いたいと考えている。

6. まとめ

本稿では酵母菌のアルコール耐性に関して細胞壁の合成に着目した後、1,3- β グルカンの合成に関する簡潔な代謝経路のモデル構築を行った。今後の課題として、まず清酒酵母である協会 7 号のデータをもちいてシミュレーションを行い、改良を加える。また 5 章に既述のように 1,3- β グルカン合成酵素の相同遺伝子の調節とその他の遺伝子による調節の機構も構築して行く予定である。

謝辞

生物学における知識やご指摘をいただいた奈良女子大学 理学部 生物科学科 鈴木教授に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] 吉澤淑 編：酒の科学，朝倉書店（1995）。
- [2] 東京農業大学短期大学部醸造学科酒類学編：醸造酵母の特性と花酵母，東京農大花酵母研究会（2006）。
- [3] 下飯仁：清酒酵母の醸造特性に関する遺伝子の解析，生物工学会誌，第 80 巻，pp.64-69（2002）。
- [4] Frans M. Klis, Pieterella Mol, Klaas Hellingwerf, Stanley Brul; Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Microbiol Rev., 26(3):239-56（2002）。
- [5] Frans M. Kis, Andre Boorsma, Piet W.J. De Groot: Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast, Vol.23, No.3, pp.185-202（2006）。
- [6] S.H. Young, R.R.Jacobs: Sodium hydroxide-induced conformational change in schizophyllan detected by the fluorescence dye, aniline blue: Carbohydrate Research, Vol.310, No.1, pp.91-99（1998）。
- [7] A. Beauvais, J.M. Bruneau, P.C. Mol, M.J. Buitrago, R. Legrand, J.P. Latge: Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*, J. of Bacteriology, Vol.183, No.7, pp.2273-2279

- (2001).
- [8] The cell 細胞の分子生物学 第4版, Newton Press (2004).
- [9] J.V. Gray, J.P. Ogas, Y. Kamada, M. Stone, D.E. Levin, I. Herskowitz: A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator, *The EMBO Journal*, 16, 4924–4937 (1997).
- [10] C. Zhao, U.S Jung, P. Garrett-Engele, T.Y. Roe, M. S. Cyert, D. E.Levin: Temperature-induced expression of yeast *FKS2* is under the dual control of protein kinase C and calcineurin, *Mol Cell Biol*, Vol.18, No.2, p.1013-1022 (1998).
- [11] KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>)
- [12] O. Richter, A. Betz, C. Giersch: The response of oscillating glycolysis to perturbations in the NADH/NAD system: a comparison between experiments and a computer model, *Biosystems*, 7(1):137-46 (1975).
- [13] B. Teusink, I. Passarge, C.A. Reijenga, et al.: Can yeast glycolysis be understood in terms of *in vitro* kinetics of the constituents enzymes?, *Eur J Biochem*, 267(17):5313-29 (2000).
- [14] M. Rizzi, U. Theobald, E. Querfurth, T. Rohrhirsch, M. Baltes, M. Reuss: In vivo investigations of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.49, No.3, pp.316-327 (1996).
- [15] F. Hynne, S. Dano, P.G. Sorensen: Full-scale model of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biophys Chem*, 94(1-2):121-63 (2001).
- [16] BRENDA(<http://www.brenda-enzymes.info/index.php4>)
- [17] P.C. Mol, et. al.: A GTP-binding protein regulates the activity of (1→3)-beta-glucan synthase, an enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis, *J. Biol. Chem.* 269:31267-31274 (1994).
- [18] Guillaume Lesage, Anne-Marie Sdicu, Patrice Me'nard, Jesse Shapiro, Shamiza Hussein, Howard Bussey: Analysis of b-1,3-Glucan Assembly in *Saccharomyces cerevisiae* Using a Synthetic Interaction Network and Altered Sensitivity to Caspofungin, *Genetics*.167:35–49 (2004).
- [19] Mazur P, et. al.: Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase, *Mol.Cell Biol.* 15, 5671-5681 (1995).
- [20] C. Zhao, U. S. Jung, P. Garrett-Engele, T. Roe, M. S. Cyert *et. al.*: Temperature-induced expression of yeast *FKS2* is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol Cell Biol*, Vol. 18, No. 2, pp.1013-1022 (1998).
- [23] R.E. Viola, F.M. Raushel, A.R. Rendina, W.W. Cleland: Substrate synergism and the kinetic mechanism of yeast hexokinase, *Biochemistry*. 16;21(6):1295-302 (1982).
- [24] M. Rizzi, M. Baltes, U. Theobald, M. Reuss: In Vivo Analysis of Metabolic Dynamics in *Saccharomyces cerevisiae* II. Mathematical Model, *Biotechnology and Bioengineering* , 55, 592-608 (1996).
- [25] Hong Gao, Julie A. Leary: Multiplex Inhibitor Screening and Kinetic Constant Determinations for Yeast Hexokinase Using Mass Spectrometry Based Assays, *J. of the American Society for Mass Spectrometry*, Vol.14, No.3, pp. 173-181 (2003).
- [26] Hong Gao, Julie A. Leary: Kinetic measurements of phosphoglucomutase by direct analysis of glucose-1-phosphate and glucose-6-phosphate using ion/molecule reactions and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, Vol.329, No.2, pp.269-275 (2003).
- [27] L. Bonofiglio, E. Garcia, M. Mollerach: Biochemical Characterization of the Pneumococcal Glucose 1-Phosphate Uridyltransferase (GalU) Essential for Capsule Biosynthesis, *CURRENT MICROBIOLOGY*, Vol.51, No.4, pp.217-221 (2005).
- [28] Mitsuhiro Abe, Ikuo Nishida, Masayo Minemura, Hiroshi Qadota, Yousuke Seyama, Takahide Watanabei, Yoshikazu Ohya: Yeast 1,3-b-Glucan Synthase Activity Is Inhibited by Phytosphingosine Localized to the Endoplasmic Reticulum, *J. Biol. Chem.* 276: 26923-26930 (2001).