

細胞内情報に基づくバイオプロセスの解析と最適化

堀内 淳一*・多田 清志

著者らはこれまで微生物培養工学的立場から、数式モデル・知識工学的手法を利用したバイオプロセスのモデリングや最適化、制御に関する研究を行ってきた。これらの手法は実用的観点からは多くの実績を上げてきているが、一方、本質的には培養経過中における微生物細胞内の代謝反応の変化を十分把握・解析した上で、バイオプロセスの最適化や制御を実現することが望ましい。しかしながら、従来培養フェーズなどの微生物の培養状態は、経験的・定性的に推定されることが多く、複雑な生体内反応を反映したアプローチはほとんど実用化されていない。

一方、近年のゲノム解析や生化学的実験手法、代謝工学の進展に伴い、遺伝子レベル、タンパクレベル、代謝レベルで細胞内のさまざまな生物情報が網羅的に得られるようになってきている。これらの生物情報は、生命システムの解析や理解²⁾はもちろんのこと、物質生産を担うバイオプロセスの解析や最適化にも有効に活用しうるだろう。このような状況を踏まえると、培養工学分野も微生物体内の代謝反応の変化を反映したバイオプロセス制御やモデリングへの展開を図る時期にあると考えられる。

本報告では、リジン発酵およびキシリトール発酵プロセスを対象に、プロテオーム解析、代謝反応モデルを適用して細胞内情報に基づいた解析と最適化を試みた例を紹介する。

プロテオーム解析に基づくリジン発酵の解析^{3,4)}

ここではリジン発酵プロセスを対象に、微生物細胞内の遺伝子産物の変化をプロテオーム解析（二次元電気泳動による生体内タンパクの網羅的動態解析）に基づき経時的に調べ、得られた生体内情報をバイオプロセス制御に活用する研究を紹介する。

図1に示すごとく、リジン生産菌である *Brevibacterium flavum*（ホモセリン要求株）では、スレオニンおよびリジンが同時に存在するとリジン生合成系に協奏的フィードバック阻害が働いている。このため、本菌によりリジンを生産する場合、最初スレオニンを含有する培地で菌体を増殖させた後、培地中のスレオニン供給を制限して協奏的フィードバック阻害を解除してリジンを過剰生産

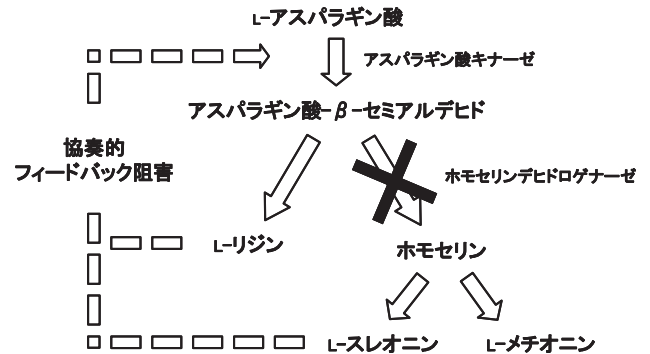


図1. リジン生産菌 *B. flavum*（ホモセリン要求株）のリジン、スレオニンおよびメチオニン生合成経路と協奏的フィードバック阻害

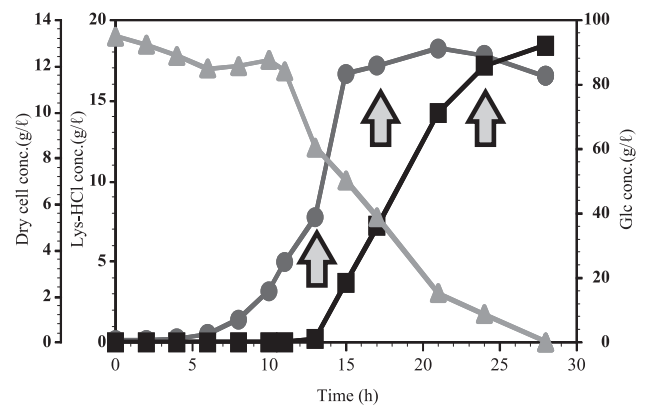


図2. *B. flavum*（ホモセリン要求株）を用いた回分培養によるリジン発酵の経時変化。矢印は左からそれぞれ、菌体増殖期、リジン生産前期、リジン生産後期におけるサンプリング時期を示す。●、菌体濃度；■、リジン濃度；▲、グルコース濃度。

する。

図2は、*B. flavum*を用いた典型的な回分培養の経時変化を示す。本菌の発酵では、培養液中のスレオニンが枯渇すると菌体増殖が停止し、同時にスレオニンとリジンの協奏的フィードバック阻害が解除されリジン生産が開始される。その結果培養開始0～15 hは菌体増殖期（比増殖速度 0.25 g-cell/g-cell・h）、培養開始15 h以降はリジン生産期（最大リジン濃度 12.9 g/l）という二つの培養フェーズが存在する。この培養状態の変化に伴う細胞内タンパクの発現状況の変化を、二次元電気泳動的に把握することが可能か検討した。

*著者紹介 北見工業大学工学部化学システム工学科（教授） E-mail: horiuchi@beta.chem.kitami-it.ac.jp

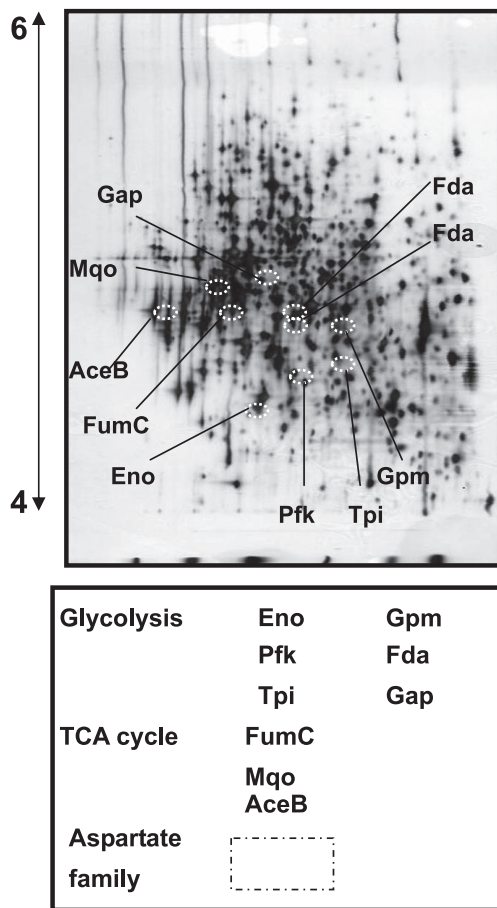


図3. リジン発酵における菌体増殖期細胞の二次元電気泳動マップと同定タンパク

この培養経過において図中に矢印で示す菌体増殖期、リジン生産前期、リジン生産後期においてそれぞれ菌体をサンプリングし解析した。菌体内タンパク質を0.1 mm ガラスビーズとボルテックスを用いたホモジナイゼーションによって抽出し、二次元電気泳動装置 Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech) により、一次元目で pH4-7, 18 cm 固定化 pH 勾配ストリップ、二次元目でポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。二次元電気泳動で分離したタンパク質は銀染色によって可視化し、二次元電気泳動マップを作成した。ペプチドマスマフィンガープリンティングによって解析された *Corynebacterium glutamicum* のデータベースに基づきスポットタンパクを同定した。

図3は増殖期における二次元電気泳動マップ(2DEマップ)の一例と同定された酵素を示したものである。

得られた菌体増殖期、リジン生産前期、リジン生産後期の3種類の2DEマップを比較すると、菌体増殖期(約480)、リジン生産前期(約450)、後期(約320)と培養フェーズが移行するにつれてタンパク質スポットが減

少し、また発現量を示すスポットの大きさも減少した。これはスレオニンが存在する菌体増殖期では菌体内のエネルギー生産などの代謝経路が活発に働いているため多くのタンパク質が発現し、一方リジン生産期の前期ではスレオニンの枯渇のより菌体増殖が抑制され、その結果、代謝に関与するタンパク質の発現量が減少したと考えられる。特にリジン生産期の後期ではスポットの数および発現量が著しく減少しており、これは長期のスレオニンの枯渇のため菌体の活性が低下した結果と考えられる。

次に培養フェーズと発現タンパク質の関連性を調べるために個々のタンパク質に注目し解析を行った。その結果、菌体増殖期では解糖系の酵素を6種類とTCAサイクルの酵素を3種類同定することができたが、リジン生産系の酵素を検出することはできなかった。これはスレオニン存在下で協奏的フィードバック阻害が働いており、リジンの過剰生産が行われていないことからリジン生合成(Aspartate family)に関するタンパク質の発現量が少ないためと考えられる。リジン生産期前期では解糖系やTCAサイクルの酵素が増殖期と同様に発現を確認することができ、さらに菌体増殖期では見られなかったリジン生産系の酵素を2種類同定することができた。リジン生産期後期ではスレオニンが枯渇し菌体の活性も下がっているためTCAサイクルやリジン生合成に関する酵素は見られたが解糖系の酵素が3種類に減少した。すなわち、リジン生産期後期では、長期のスレオニン枯渇により代謝活性が低下していることを反映してTCAサイクルや解糖系の酵素スポットが減少あるいは消滅したと考えられる。

これらの結果から、二次元電気泳動により菌体増殖期とリジン生産期で異なるタンパク質の発現状況を把握することが明らかとなり、これまで経験的に定義されてきた微生物培養フェーズを細胞内タンパクの発現状況に基づき理解することが可能となると考えられる。今後、さらに未同定のタンパク質の同定を行い、二次元電気泳動からの情報を代謝モデルに反映する予定である。

代謝反応モデルに基づくキシリトール発酵の最適化⁵⁾

機能性糖アルコールであるキシリトールは、現在主にキシロースの化学的還元により製造されているが、環境負荷が高くバイオプロセスによる代替製造法が検討されている。キシロース資化性酵母を利用したキシリトールの微生物生産はその中でも有力な候補である⁶⁾。図4は、キシロース資化性酵母のキシロース代謝経路を示している。細胞内に取り込まれたキシロースは、キシロース還元酵素によりキシリトールに変換される。通常の好氣的

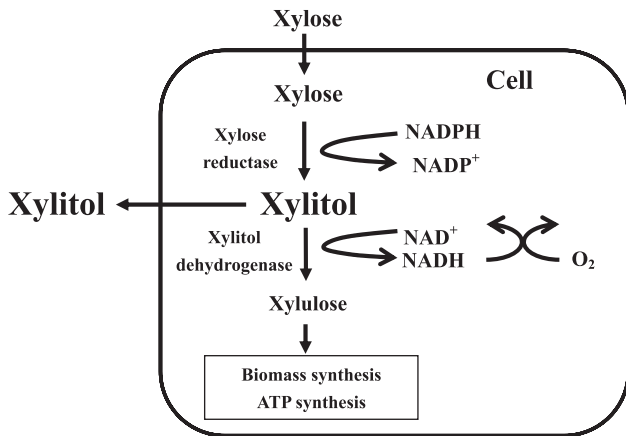


図4. キシロース資化性酵母におけるキシロース代謝

培養ではこのキシリトールはさらにキシロースを経て細胞内で代謝されるが、酸素供給が制限された場合には、NADHの供給が不十分となりキシリトールのキシロースへの酸化が進まずキシリトールが菌体外に分泌される。キシリトールの微生物生産ではこの代謝経路を利用する。

このため実プロセスにおいてキシリトール生産を向上させるためには、酸素供給速度を適切に制御することが重要となる。従来は実験により試行錯誤的に最適な酸素供給速度条件を探していたが、細胞内の代謝反応に基づいて最適条件を合理的に決定できればより望ましい。そこで、キシリトール収率の向上を目的に、キシリトール生産に及ぼす酸素供給の影響を代謝反応モデルを用いて解析し、酸素供給速度の最適化を行った。菌株はキシロース資化性酵母である *Candida magnoliae* (筑波大より分譲) を用いた。本菌では微好気条件下においてキシロースからキシリトールを効率的に生産する。コーンコブ加水分解物を培地とし、酸素供給速度を制御した回分培養を行い、種々の酸素移動速度 (OTR) 条件におけるキシリトール生産を検討した。

種々の OTR 条件下のキシリトール発酵における菌体内の代謝経路のフラックスを解析するために、代謝経路に関する知識に基づいて代謝反応モデルを構築した。代謝反応モデルを構築する際には、主要な代謝経路を組み合わせ 20 の代謝物質と 17 の代謝経路を考慮し、物質収支に基づいた簡略化モデルを Mavrovouniotis ら⁷⁾ の方法を参考に作成した。

このモデルは E を 20×37 の化学量論係数の行列、 r は 37×1 の速度ベクトルとした場合、行列式を用いて

$$E r = 0$$

と表現できる。この式は、本代謝反応モデルの物質収支

式 (拘束条件) であり、変数の数が 37 であるのに対し式が 20 であるので、自由度は 17 になる。

この代謝反応モデルを用いてキシリトール生産を最適化する問題は、次のような問題に定式化することができる。

目的関数：キシリトール生産フラックス \rightarrow 最大
 制約条件： $E r = 0$

この問題は評価関数及び制約条件は線形条件であるので、線形計画問題となり、理論的には線形計画法を用いて解くことが可能である。しかしながら独立変数が多いとシンプレックス法などは計算時間が多大となり直接適用することができない。そこでまず、独立変数の数を減らすため、菌体内の中間代謝物質フラックスが擬定常状態であると仮定すると、モデルに含まれる 12 の中間代謝物質の比速度がゼロとなる。これにより、37 の変数の内の中間代謝物質速度を示す 12 の変数の式が決定する。よって、自由度は

$$37 - 20 - 12 = 5$$

となる。自由度が 5 であるのでこの条件を満たす解の組み合わせは無数に存在するが、「キシリトール生産フラックスを最大化する」条件を付加し、シンプレックス法を適用することで一意に決定できる。すなわちキシリトール生産フラックスを最大化する代謝フラックス分布が計算され、その結果から必要な酸素供給フラックスが得られ、その値と実験結果から最適な OTR 条件を決定できる。酸素供給速度 (OTR) を操作変数、代謝反応式を制約条件、さらにキシロース比消費速度を 100 としたとき、キシリトール収率を最大化する代謝フラックス分布を計算した結果を図 5 に示した。

その結果、キシリトール収率を最大にする酸素消費代謝フラックスが 56 のとき、最大キシリトール収率は 80 と計算された。これは生成した ATP は、菌体内へのキシロースの取り込みにほとんどが使用され、菌体増殖が抑えられる状態を表している。この結果をもとに、OTR が $0.5 \text{ mmol-O}_2/\text{l} \cdot \text{h}$ のとき最大キシリトール収率 80.7% が得られると予想された。この結果を実験的に検証した結果を図 6 に示す。最大キシリトール収率は 75% となり、キシリトールの生産収率を従来の約 60% から大幅に向上させることができた。

図 7 に酸素供給速度 (OTR) とキシリトール収率との関係を示す。図中の破線は従来の繰り返し実験による方法で検討していたもので、図中の三角は代謝反応モデルにより得られた最適値、黒丸は最適化された酸素供給速度に基づく実験結果を示している。

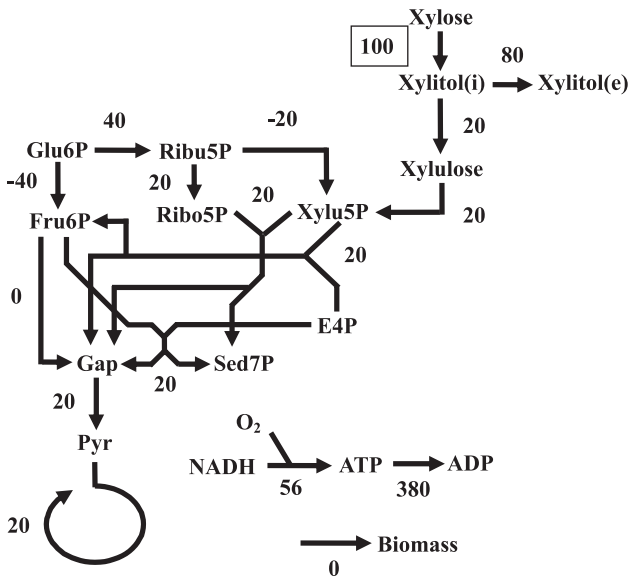


図5. キシロース生産を最大化する代謝フラックス

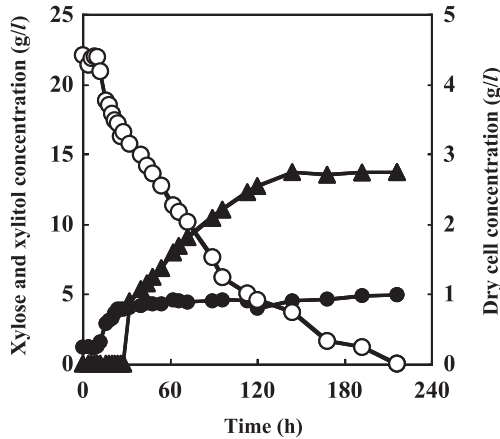


図6. 酸素供給を最適化したキシリトール発酵の経時変化. ○, キシロース濃度; ▲, キシリトール濃度, ●, 菌体濃度.

図から明らかのように、代謝反応モデルにより狭い領域に最適OTRが存在することが示唆され、それが実験的に実証されたことが分かる。従来の試行錯誤的な方法でも実験回数を大幅に増やすことにより同様な結果を得ることは可能であるが、代謝反応モデルを用いることにより、より少ない実験結果に基づいて、より信頼性の高い培養条件の探索を行うことのできる点に利点がある。

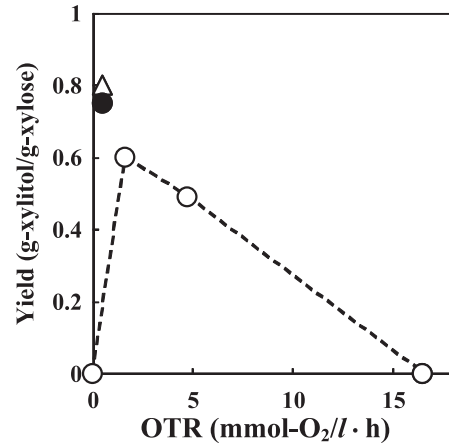


図7. キシリトール収率に及ぼす酸素供給の影響. ○, 従来の結果; △, 代謝反応モデルに基づく最大キシリトール収率(計算値); ●, 最適酸素供給速度に基づいたキシリトール収率(実験値).

まとめ

プロテオーム解析や代謝反応解析では、当然のことであるがゲノム解析とは異なり同一細胞であっても培養条件や細胞の生理学的状態により、無数の異なる結果が生じうる。またプロテオーム解析のような網羅的な方法では、細胞側の置かれた条件とプロテオーム解析結果との関係性こそが解析の鍵であるため、漠然とした条件設定では意義のある結果を得ることはなかなか難しい。このためプロテオーム解析や代謝反応解析を行う際には、どのような観点で何を明らかにすべきかを十分絞り込んで実験を計画するかが重要なポイントである。

これらの手法が、微生物反応の複雑さのために簡便な数式モデル・知識工学的手法などのブラックボックスの手法に依存してきた培養工学を、生体内情報に基づくより深い理解と裏づけを持った技術・研究分野へと展開していく有力な手段となることを期待したい。

これらの研究は文部科学省科学研究費補助金(課題番号14550764および17560686)の助成を得た。

文献

- 1) Horiuchi, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 574 (2002).
- 2) 北野宏明: システムバイオロジー, 秀潤社 (2001).
- 3) 粕谷 聡ら: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.160 (2004).
- 4) 粕谷 聡ら: ソフトウェアバイオロジー, **4**, 51 (2005).
- 5) Horiuchi, J. et al.: *J. Biotechnol.*, **118**, Suppl. 1, S120 (2005).
- 6) Tada, K. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 228 (2004).
- 7) Mavrouniotis, M. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 1119 (1990).