

合成生物学の技術的展望

岡本 正宏

はじめに

細胞を、多数の相互作用する生体分子ネットワークからなるシステムとして捉える「システム生物学」と呼ばれる研究が行われているが、すべてのネットワークが十分には理解されてはいないため、真の意味での「システム生物学」は完成しておらず、現状では、遺伝子、mRNA、代謝物などの大量のデータを「眺めて解析する生物学」にとどまっている。

一方、このような生体分子ネットワークを「眺めて解析する生物学」から、「つくって解析する・利用する生物学」を目指し、2000年頃から米国で合成生物学¹⁾という研究が行われている。「つくって」と言っても「無から生物をつくる」ことを指しているのではない。サイエンスの面では、同定済みの相互作用する生体分子を組み合わせた人工遺伝子回路を設計して、振動やスイッチなどの特定の細胞内現象を再現させようとする試みがなされている。また、応用面では、別の生物由来の酵素遺伝子を複数組み合わせた人工代謝経路を設計し、その生物が本来生産できない物質を大量生産させる試み²⁾が行われている。しかしながら、人工遺伝子回路や人工代謝経路は小規模であり、trial and errorで構築されているのが現状であり、合成生物学を展開するための技術基盤はいまだ確立されていない。一方、生体分子ネットワークは、ホメオスタシスと環境適応の両面を持っており、現在広く行われている一つまたは少数の遺伝子の過剰発現・破壊を行っても、ネットワークの応答に変化がないことが多い。このため、生体分子ネットワークに積極的に働きかけるような振動やスイッチなどの機能を持つ人工遺伝子回路を導入し細胞応答を詳細に解析する研究、ES細胞、iPS細胞にさまざまな分化誘導因子を人工遺伝子回路で導入することで分化系譜を探索する研究、細胞のセンサータンパク質と組み合わせ外的環境に自ら適応して物質生産を行わせる細胞工場を実現する研究、などを通じて生物をより深く理解し、広く利用することが可能になると考えられる。

代謝工学への適用のためには、目的代謝産物生産に向けて、①どの反応ステップがボトルネックになっているのかを特定し、②それを解消するためにどのような方策が必要なのか、③効率的な生産のための人工代謝経路や人工遺伝子回路を設計することが可能なのかなどの検討が必須となる。ここでは、合成生物学の分野が深化するための技術的展望（期待を込めて）について述べる。

合成生物学の技術基盤

1999年度より、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究（研究提案提案型・複合領域）「動的・多要素な生体分子ネットワークを理解するための合成生物学の基盤構築」（<http://www.syn-biol.com/>）が進行中である。そのなかで、合成生物学の技術基盤を提案しており、図1のようにまとめられる。

図中で、動的とは「時間変化をする」、多要素とは、「遺伝子数が多い」という意味である。合成生物学手法の代謝工学への適用については、図1の生物化学工学、具体的には動的な人工遺伝子回路を構築する技術が必須である。これまでの研究で、別の生物由来の酵素遺伝子を複数組み合わせ合わせた人工代謝経路を設計し、その生物が本来生産できない物質を大量生産させる試みはすでに多数発表されており、その多くは、組み入れた特定の遺伝子発現量を局所的に最適化することに主眼がおかれている。しかしながら、さらなる目的代謝産物生産の効率化のためには、時間的に変化する培養環境や細胞内環境にตอบสนองして人工遺伝子回路を作動させ、目的代謝産物生産へ代謝経路を方向づける戦略が必要となるだろう。このような動的な人工遺伝子回路の構築には、図1の進化分子工学、微小流体工学、シミュレーション工学などの工学や情報科学分野の技術との連携が効果的である。具体的には、①進化分子工学手法：目的の環境にตอบสนองするセンサータンパク質の改良、②微小流体工学手法：マイクロ流体デバイスを用いた、微小環境を精密にコントロールする装置開発、③シミュレーション工学手法：目的の応答特性を持つ人工遺伝子回路の設計、である。これらの手法を用いて、さまざまな実験条件下での無細胞中の人工遺伝子回路の動的特性（時間的応答特性）を精査することによって、効率よく生体内（*in vivo*）に人工遺伝子回路を組み入れることができるものと期待される。

代謝ボトルネックの探索・解消方策の推定法

アセトン・ブタノール・エタノール（ABE）生産菌（*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC13564）を用いたブタノール高生産を例にして、ブタノール生産に対して、どの代謝反応段階がボトルネックになっているのか、また、どのような方策が必要なのかの推定法について述べる。グルコースを初期基質としたときのABE発酵菌 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824の代謝経路³⁾を図2に示す。図の点線で示され

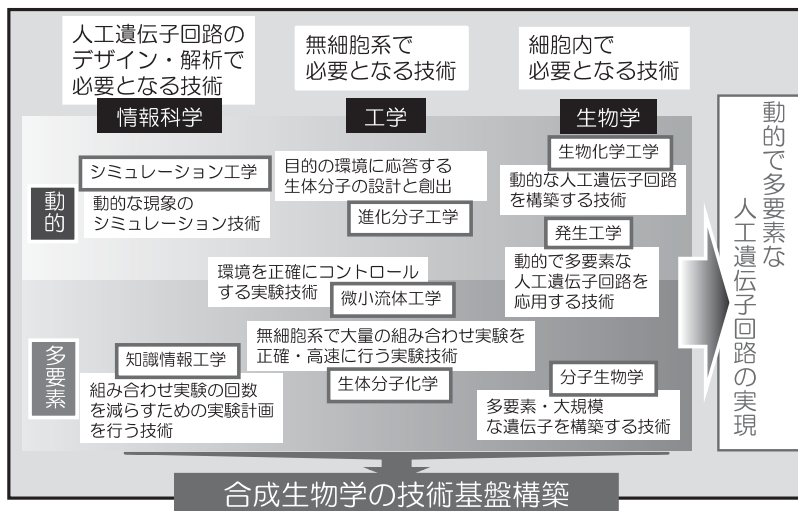


図1. 合成生物学の技術基盤

るように、酸生成期においては、ATP合成を伴う有機酸（酢酸、酪酸）が生成され、その後、図の太線で示されるように、溶剤生成期においては、これらの有機酸を再同化して、アセトン、ブタノール、エタノールを生産するという2つの代謝フェイズからなる複雑な代謝系を有する。

近年、ABE発酵Clostridiaに関しても遺伝子改変のための手法が開発されてきたこと、オミックス解析が適用されるようになってきたこともあり、代謝系のシステム解析が行われるようになった。進藤ら⁴⁾は、上記N1-4株を用いて、初期グルコース濃度36.1 mM, 70.6 mM, 122 mM, 295 mM, 培地300 mL, 発酵温度30°C, 初期培地pH 6.5の回分培養を行い、各初期グルコース濃度条件における、グルコース、アセトン、ブタノール、エタノール、酢酸、酪酸、菌体濃度のタイムコースを測定し、それらの実験データを再現するキネティックモデルを構築した。その後、高グルコース濃度（495 mM）の条件下での実験データと、ブタノールによる菌体増殖阻害実験でのデータを考慮し、キネティックモデルの改良を行った⁵⁾。構築したモデルの検証を行うために、実験データと計算データとの比較を行った。その結果を図3, 4, 5に示した。いずれの場合も、シンボルが実験データ、曲線がシミュレーションで得られた計算データである。その結果、初期グルコース36.1 mM, 70.6 mM, 122 mM, 295 mM, 495 mMでの各測定代謝物質の実験データと計算データとの相関係数がそれぞれ、0.817, 0.969, 0.926, 0.896, 0.869, となり、初期グルコース濃度を13.7倍以上変化させても実験データをほぼ再現しうるキネティックモデルを構築した。

次に、構築したキネティックモデルを用いて、各速度パラメータ (K_m , V_{max} , K_i など)の値の変化がブタノール

ル生産にどのように及ぼすのかについての感度を培養時間内の各時刻で精査した。ここでいう感度とは、システム内の任意のパラメータの単位%あたりの変化に対し、代謝物質濃度や代謝流束などの従属変数が、変化なしのコントロールに比べて何%変化したかの変化率を表す。感度解析とは、この感度を網羅的に算出し、解析する方法で、感度の絶対値が大きければ、そのパラメータの値の変化は、システムの挙動の大きく寄与することになる。すなわち、構築したキネティックモデルを用いて、ブタノールの生産量変動に寄与するすべてのキネティックパラメータの感度を調べ、感度の高いパラメータに関与する酵素の特性 (K_m 値や V_{max} 値など)を改変することで、ブタノールの生産量を増大させるストラテジーを推察することができる。

感度解析には、従属変数の値が時間的に変動していない定常状態での感度を解析する静的感度解析と時間的に変動している過渡状態での感度を解析する動的感度解析⁶⁾がある。動的感度解析は、定常状態が存在しない振動系や、定常状態が存在する系でも外部からの摂動などにより、過渡状態（非定常状態）にある系に対しても適用可能である。代謝物質濃度についての動的感度は、次式で表される。

$$S(X_i(t), p_j) = \frac{\partial X_i(t)}{\partial p_j} \cdot \frac{p_j}{X_i(t)} \cong \frac{X_{i-1\%}(t) - X_{i-control}(t)}{X_{i-control}(t)} \times 100 \quad (1)$$

ここで、 $X_i(t)$ は時刻 t における代謝物質 X_i の濃度、 p_j はキネティックパラメータ、 $S(X_i(t), p_j)$ は、キネティックパラメータ p_j に対する時刻 t における代謝物質 X_i の濃度 $X_i(t)$ の動的感度 (%)を示している。また、近似式中の $X_{i-1\%}$, $X_{i-control}$ は、それぞれ、任意のキネティックパラメータ p_j を単位%変化させた場合と、させなかった場合の代

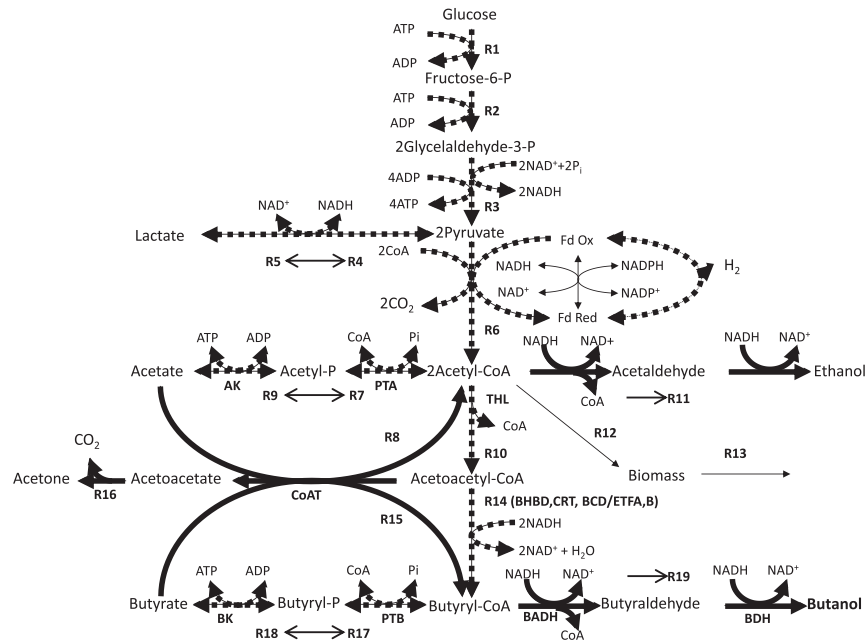


図2. *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824の酸生成期, ソルベント生成期における代謝系 (Jones and Woods, 1986より改変). 太矢印, 太破線矢印は, それぞれ, ソルベント生成期, 酸生成期における主な炭素の流れを示している. Ri (i=1, 2, 3, …, 19) は構築したキネティックモデルの流束式に相当する反応過程を示している. 太字で示された酵素の略号は以下の通りである. AK, acetate kinase; PTA, phosphotransacetylase; THL, thiolase; BHBD, β -hydroxybutyryl-CoA dehydratase, CRT, crotonase; BCD/ETF, butyryl-CoA dehydrogenase/electron transfer flavoprotein complex; BK, butyrate kinase; PTB, phosphotransbutyrylase; BADH, butyraldehyde dehydrogenase; BDH, butanol dehydrogenase.

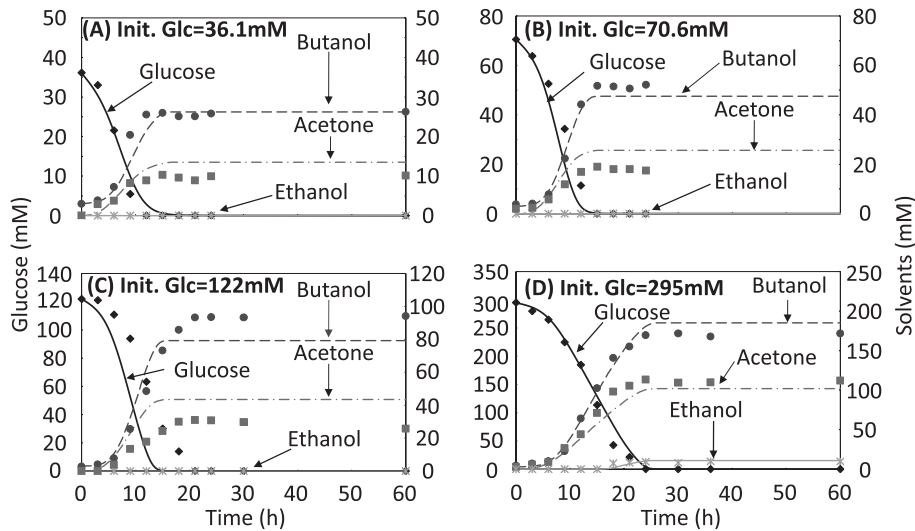


図3. 回分培養実験におけるグルコース, アセトン, ブタノール, エタノールの実験値とシミュレーション値の比較. 初期グルコース濃度はそれぞれ, (A) 36.1 mM, (B) 70.6 mM, (C) 122 mM, (D) 295 mM. 実験値のエラーバーは省略した.

代謝物質 X_i の濃度を示している. 計算された動的感度から以下の手順で目的代謝物質 (この場合, ブタノール) 生産増大のための遺伝子改変候補 (代謝ボトルネック候補) を絞り込む.

①目的代謝物質生産代謝系のキネティックモデルに対し

て動的感度解析を適用する.

②各キネティックパラメータに対する目的代謝物質の濃度の感度に注目し, 任意の時刻におけるそれらの感度の絶対値でランキングする.

③ランキングの結果の上位10位に入ったキネティック

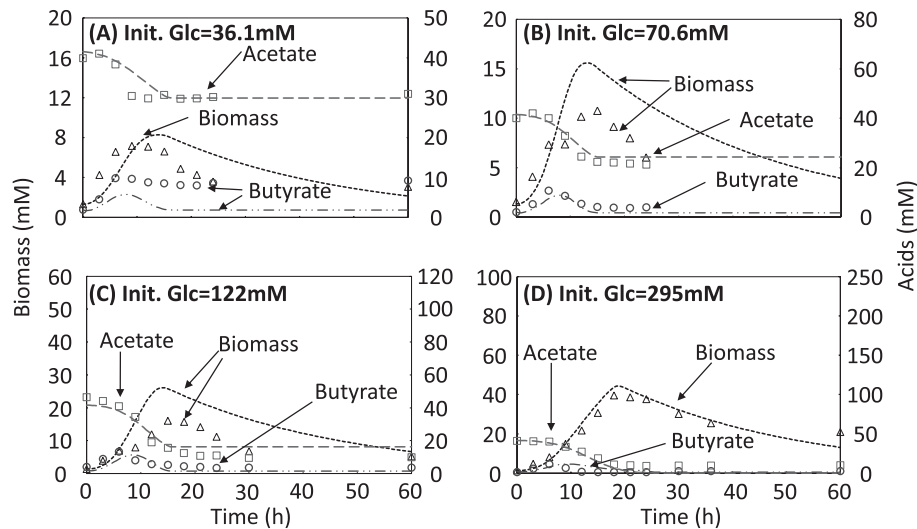


図4. 回分培養実験における酢酸, 酪酸, バイオマスの実験値とシミュレーション値の比較. 初期グルコース濃度はそれぞれ, (A) 36.1 mM, (B) 70.6 mM, (C) 122 mM, (D) 295 mM. 実験値のエラーバーは省略した.

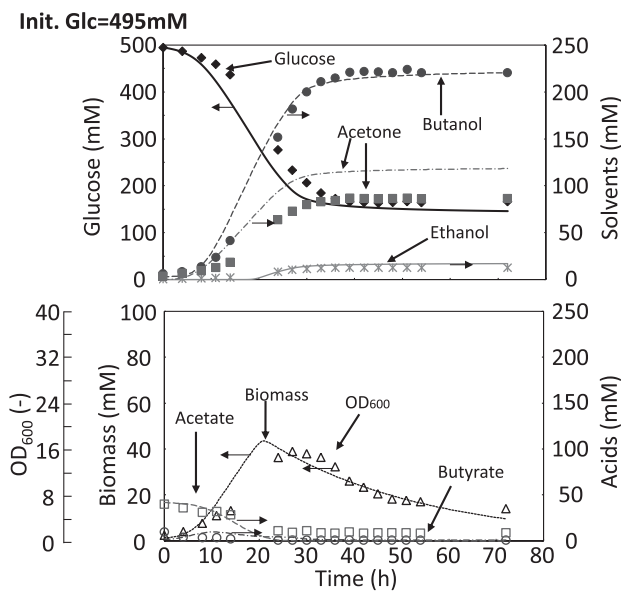


図5. 回分培養実験における実験値とシミュレーション値の比較. 初期グルコース濃度は, 495 mM. 上図は, グルコース, アセトン, ブタノール, エタノール濃度のタイムコース. 下図は, 酢酸, 酪酸, 菌体濃度 (シミュレーション値はバイオマス濃度, 実験値はOD600).

パラメータを含む酵素反応過程 (図2のRがついているものが酵素反応過程を表す) をその時刻における目的代謝物生産増大のための遺伝子改変候補 (代謝ボトルネック候補) とする.

初期グルコース濃度 295 mM 回分培養のデータ (図3 (D), 図4 (D)) を用いて, 培養時間4時間, 10時間, 20時間, 30時間での動的感度解析を行った. 各時間での

上位10位までの感度ランキングを調べ, その結果を代謝経路上に書き入れたものを図6に示す. 図6 (A) より, 培養の初期 (酸生成期) においては, グルコースの取り込みおよび解糖, バイオマス合成 (R12), CoATを介さない酪酸再同化 (R17) の促進がそれぞれ, 高ブタノール生産に寄与すると考えられた. また, acetyl-CoAからのacetoacetyl-CoA生産 (R10), 酪酸生産 (R18) の抑制が高ブタノール生産に寄与することが示唆された. 図6 (B), (C) より, 培養の中期・後期 (溶剤生成期前期・後期) においても, 高ブタノール生産に寄与する遺伝子改変方策はほぼ同様であった. 大きな違いは, ソルベント生成後期 (図6 (C)) におけるブタノール生産過程 (R19) の抑制であった. 一方, 培養終期 (図6 (D)) では, acetyl-CoAからのacetoacetyl-CoA生産 (R10), acetoacetyl-CoAからのbutyryl-CoA生産の促進 (R14), CoAT経路 (R8, R15), バイオマス合成 (R12) の抑制がそれぞれ, 高ブタノール生産に寄与することが示唆された. このように, 図6より, 培養の時間帯において高ブタノール生産に寄与する遺伝子改変方策は変動していた.

このようにして, 目的代謝物に対する代謝ボトルネックを推定し, その解消方策を見いだすことが可能となる.

合成システム生物学の創成

実験データを再現しキネティックモデルを構築し, そこに含まれるすべてのキネティックパラメータのブタノール生産に及ぼす動的感度を精査した結果, 図6の実線の四角の反応過程を促進し, 破線の四角の反応過程を抑制することで, ブタノール生産が増大すると予測され

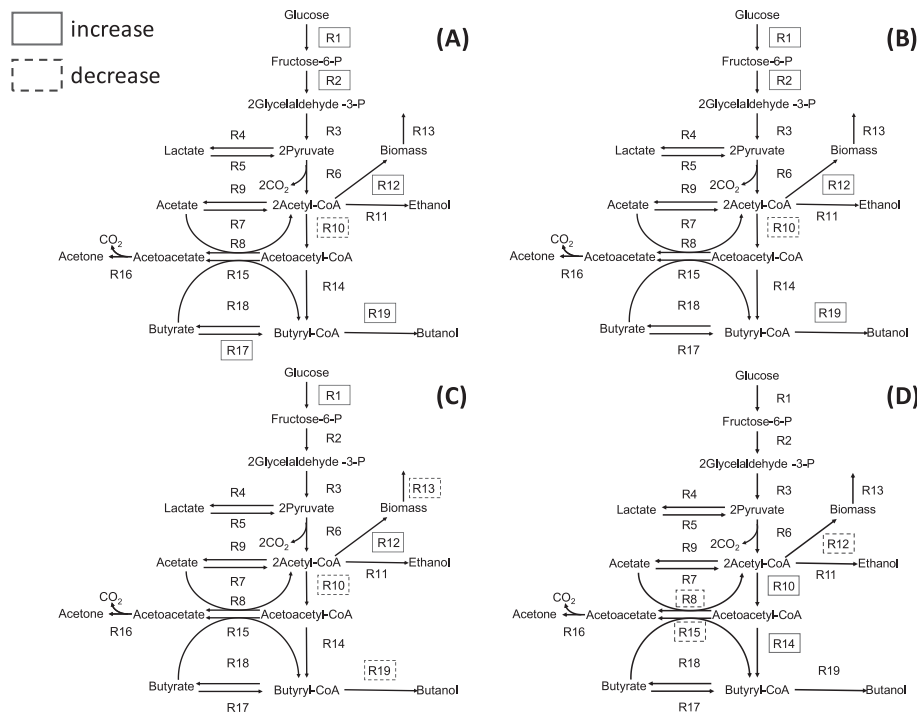


図6. 初期グルコース濃度295 mM回分培養時の任意の時刻におけるブタノール生産増大のための遺伝子改変方策. (A) : t=4 hr, (B) : t=10 hr, (C) : t=20 hr, (D) : t=30 hr. 太線で囲まれた反応過程のt=0 hrでの増大, または破線で囲まれた反応過程のt=0 hrでの抑制が, 各時刻でのブタノール生産増大に大きく寄与することを示す.

た. 増産に向けた第一歩としては, これらの反応過程を触媒する酵素の転写因子を精査しなければならない. そして, それらの情報をもとに, 酵素活性を連携制御する人工遺伝子回路が構築できれば, 目的代謝産物のさらなる増産が期待できる. 現在のところ, 人工遺伝子回路として1段トグルスイッチ⁷⁾ (オンとオフなど二つの状態が交互に生じるスイッチ) が主体であるが, 連携制御を行わせるには, 多段トグルスイッチが必要となる. このような人工遺伝子回路は, 代謝マップの階層とは異なる階層に属することになり, 代謝の流束は, 異なる階層からの制御を受けて動的に変化することになる. 将来, 構築した人工遺伝子回路を微生物に組み入れることができれば, まさに新奇的な代謝物質生産のプロセスの構築が可能であろう.

システム生物学はトップダウンアプローチであるのに対し, 合成生物学はボトムアップアプローチである. しかしながら, 両者は相反するものではなく, 人工遺伝子回路を組み入れた合成代謝システムのシステム生物学的解析が必要となる (図7参照). このように, 合成システム生物学の創成・発展が, 合成生物学の将来像であると期待する.

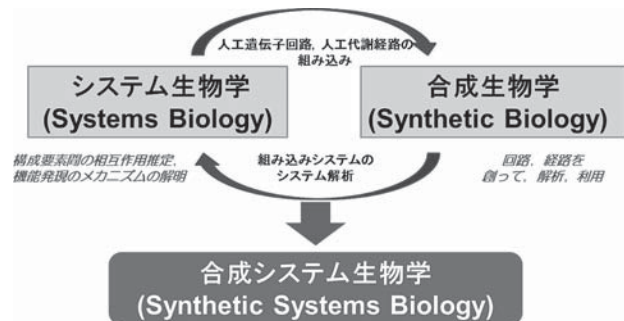


図7. 合成システム生物学

文献

- 1) 柳川弘志ら: 合成生物学 (現代生物科学入門9), 岩波書店 (2010).
- 2) Hanai, T. et al.: *Applied and Environ. Microbio.*, **73**, 7814 (2007).
- 3) Jones, D. T and Woods, D. R.: *Microbiol. Rev.*, **50**, 484 (1986).
- 4) Shinto, H. et al.: *J. Biotechnol.*, **131**, 45 (2007).
- 5) Kuriya, Y. et al.: *Chem-Bio Informatics Journal.*, **11**, 1 (2011).
- 6) 白石文秀: バイオケミカルシステム理論とその応用, 産業図書 (2006).
- 7) Gardner, T. S. et al.: *Nature*, **403**, 339 (2000).