

生命現象の数理表現と生命システムデザイン

清水 浩

微生物の代謝を改変し、発酵プロセスでその能力を最大限発揮させ、プロダクトを得る……生物工学に携わる者の夢であり、理想である。微生物の育種からプロセス開発まで、生物化学工学にはどのような使命があり、何ができるのであろうか。生命現象の数理表現は、生物工学にどのように貢献をするのか。最近の生命科学の進歩はどのような新たな学術の地平を生物工学にもたらしめるのか。育種からプロセス開発にいたる諸過程を通して考えてみたい。

古典に触れる—生物化学工学と物質収支の捉え方

合葉、ハンフリー、ミリスによる生物化学工学¹⁾が出版されたのは1973年である。その序章において、著者らは、「生物化学工学は生物学という生命の本質を明らかにする科学分野に、工学設計という概念を持ち込んだこと」が記されている。その中で、発酵プロセスの特徴として好気発酵を例にあげ、発酵槽の中には、気相、液相、微生物という三者が存在し、気相から液相への酸素移動および液相から酸素や栄養の微生物への移動の理解の重要性とこれらの理解に基づく発酵槽の設計や運転法の開発の原理が述べられている。

また、今世紀が幕を明ける時期において、微生物の代謝経路を物質収支の概念を基礎に解析し、合理的に代謝を改良することで、目的生産物の生産収率や生産性を効果的に向上させる代謝工学²⁾が大きく発展したが、これも、微生物代謝経路のシステムとしての数理解析に、設計の概念を微生物育種に持ち込んだものといえよう。

物質収支の導き方

プロセスの運転や設計といった工学的意思決定（工学デザイン）を行うには、生命現象の数理表現（モデリング）が必要である。その基盤的な概念は、物質収支、反応動力学、熱力学の考え方である。

物質の収支の考え方は図1に示すようにシステムに流入する量、流出する量、システム内で生成する量、システム内で消費する量の差し引きで表され、

$$(\text{蓄積量}) = (\text{流入量}) - (\text{流出量}) + (\text{生成量}) - (\text{消費量}) \quad (1)$$

である。システムの境界線をどこに見立てるかは解析や設計を行う研究者に委ねられており、システムの境界線をしっかり頭において、この式を立てることが重要である。それが達成されれば、解析対象の生命システムが、遺伝子の転写（mRNA合成）とmRNA分解、代謝経路上のフラックス分布、発酵槽の栄養と菌体の変化、などの種類を問わず、数理表現が可能となり、その数式を用いて生命システムの現象を解析できる。

(1) 式を単位時間当たりの表現に変えて、時間を無限小に近づけると微分方程式表現になる。微分方程式を解析法やコンピュータによる数値解法などによって解くことができれば、生命現象の時間的変化（時間発展）を得ることができる。

反応動力学はおもに生成項や消費項がどのような関数で与えられるかを議論する分野であり、詳しくは後に説明する。熱力学は発酵熱除去の問題や代謝の可逆性の議論などに登場するが、今回はこの領域の議論には踏み込まない。

溶存酸素の確保—好気発酵槽設計への応用

酸素分子は常圧常温で水に対する飽和溶解度が10 mg/L以下と非常に小さいため、好気微生物の能力を発揮させるには、気相から液相への酸素の移動をいかに効率よく行うか、そのために必要な通気攪拌のための動力がいくらになるかが工学的な重要課題である。

気相から液相への酸素の移動現象を記述するのは水中の泡の表面積の分布、気相から液相への分子拡散が(1)式の考えを使って数理表現できなければいけないが、す

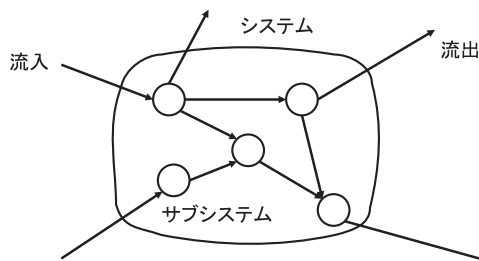


図1. 物質収支の考え方

すべての泡の表面積分布を知ることは容易ではない。化学工学は、この泡と液相のマイクロな移動現象を、発酵槽内の溶存酸素濃度変化というマクロな記述として完成させることに成功している。

$$\frac{dc}{dt} = k_L a (c^* - c) - Q_{O_2} X \quad (2)$$

ここで c , k_L , a , c^* , Q_{O_2} , X はそれぞれ、培養液中の溶存酸素濃度、液側境膜酸素移動係数、単位液体積あたりの泡の平均表面積（比表面積）、飽和溶存酸素濃度、菌体の酸素比消費速度、菌体濃度である。 k_L , a は、もともとは別の変数であるが、亜硫酸ソーダ法やダイナミック法などの実験法により、ひとまとめにした $k_L a$ の値として決定することができるところが工学的に大変意義深い。

攪拌回転数を上昇させて、酸素供給を確保するのは、泡を攪拌翼で細かく切って、 $k_L a$ の a を稼いでいるし、供給ガスの酸素分圧を上げるのは c^* を上げようとしているのに対応している。自分の使う微生物菌体の酸素比消費速度を知り、それに見合う酸素供給を確保するために攪拌回転数と $k_L a$ の関係を知っておく（設計しておく）ことは生物工学者にとって必須の項目である。

培養槽の栄養源の物質収支（連続培養を例に）

今度は、菌体を連続培養槽で培養する際の物質収支について考える。

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= (\mu - D)X \\ \frac{dS}{dt} &= D(S_f - S) - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \end{aligned} \quad (3)$$

μ , D , S , S_f , $Y_{X/S}$ はそれぞれ、菌体の比増殖速度、希釈率（培養液の体積と栄養培地の流入速度の比）、培養槽内の栄養源濃度、供給培地中の栄養源濃度、対糖菌体収率である。(1), (2) 式に比べると変数が多く複雑なようだが、(1) の考え方を理解していると連続発酵槽の図を頭に思い浮かべれば、自然に(3)式が書けるようになるはずである。合葉らの成書¹⁾などにたくさん紹介されているが、現象を頭の中で思い浮かべて抽象化し、(3)式を自分で記述できるように心がけるとよいと思う。

ここで、比増殖速度は菌体が与えられた環境で生育できる能力を現しており、

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \quad (4)$$

と書ける。ここで、 μ_{\max} , K_S は、定数パラメータである。(4)式は提唱者の名前を取って Monod (モノ) 式と呼ばれる。この式は、菌体の生成項を環境変数 S で表現した反応動力学の表現である。

(3), (4) 式から、システムの初期状態から時間的に各変数がどのように変化するかを議論することができる。また、希釈率は栄養培地を供給する流量を変えて操作できる操作変数であり、定常状態で得られる菌体濃度、栄養源濃度の関係や、定常状態からずれた場合に、もとの定常状態に戻るかといったシステムの安定性の問題などを議論できる。

マイクロへの広がり—代謝工学の発展

今度は、マイクロな現象の記述を考えてみよう。図1の(楕円で表した)システムを細胞、内部のサブシステムを代謝と考えてみよう。細胞は外部から栄養源や酸素など生育に必要なものを取り込んで、代謝反応経路を動かしながら DNA, タンパク質などの巨大分子を含む自らの構成要素の合成、そのためのエネルギー生成、反応を動かすための酸化還元力を得て、自らを維持したり、分裂・増殖したりしている。ゲノムの DNA 配列がすべて読まれ、細胞内にはおよそ、どのような代謝反応が存在するかがわかってきているので、代謝反応を化学量論式で羅列的に記述することによって、代謝経路上の物質の流れの収支を取ることが可能となる。

ここに、図2に示す細胞内代謝物質 B, D, について細胞あたりの代謝物質濃度 B (mol/cell), D (mol/cell) の時間当たりの変化を記述すると

$$\begin{aligned} \frac{dB}{dt} &= v_1 - v_2 - v_3 \\ \frac{dD}{dt} &= v_3 - v_4 - v_5 \end{aligned} \quad (5)$$

と書ける。つまり、上流の代謝経路から流れ込んでくる代謝フラックスと下流に流れ去る代謝フラックスの差として代謝物質濃度の蓄積や減少が表される。微生物では、この反応や代謝物質の数がおよそ千のオーダーある。細胞が恒常的に増殖し、物質を生産するためには、代謝物の細胞内濃度の時間変化はゼロであると仮定すると(5)式の代謝物濃度時間変化はゼロとなり、線形代数方程式で表現できる。

一般的には、

$$\begin{aligned} Mv &= 0 \\ \alpha &\leq v \leq \beta \end{aligned} \quad (6)$$

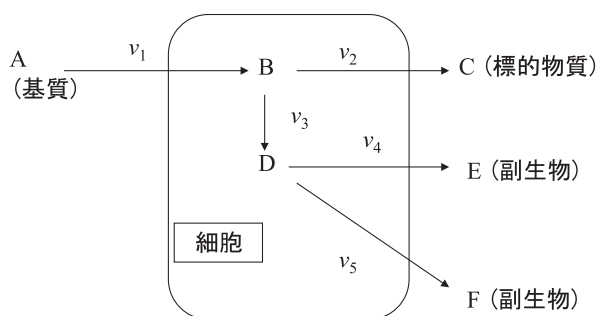


図2. 仮想的なシンプル細胞モデルによる代謝フラックス物質収支

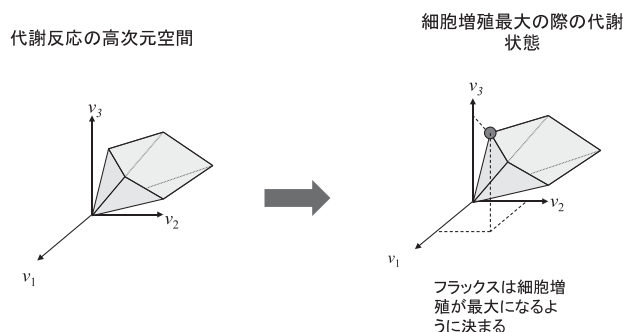


図3. 線形計画法による代謝フラックスの決定

と書ける。ここで、 M は化学量論行列、 v は代謝フラックスベクトルである。 α 、 β は代謝フラックスの上下限値を示すベクトルである。

(6) 式の行列やベクトルは代謝物質や代謝反応の数に応じて千程度の次元となる。与えられた環境条件や遺伝子の削除、導入を行った場合、各代謝フラックス r_i (mol/h/cell) が、どのような値を示すかは(6)式だけでは決定することができない。しかし、細胞は「代謝フラックスを与えられた環境下で細胞増殖を最大とするように自己組織化する」という大胆な仮定を置くと線形システムの最適化問題となって代謝フラックスは決定される。このような方法を最初に考案したのはパルソンらであり³⁾、その有用性がさまざまな解析において認められている。図3に高次元の代謝空間における代謝フラックスの決定のイメージを示す。

我々の研究グループでは、この方法の有用性を検証するために、コリネ型細菌のゲノムスケール代謝モデルを自ら構築するとともにグルコースの取込みに対して酸素の供給をさまざまに変化させた実験を行って、乳酸、酢酸、コハク酸などの有機酸の生成フラックスが各実験データときわめてよく一致することを示した⁴⁾。すなわち、与えられた環境状態に対して細胞の代謝フラックスがどのようになるかをシミュレートすることが可能となったと言える。シミュレーションでは、このようなことが十分表現され、実験データを表現していることがわかる。この方法を用いることにより、標的物質を最大生産するためにどのような遺伝子を削除することが有効か、*in silico*プラットフォーム上でデザインすることが可能となった⁵⁾。

これらの遺伝子削除は、*in silico*プラットフォーム上では、その遺伝子がコードするタンパク質の触媒する代謝反応を削除すること、または、代謝フラックスを強制的にゼロにすることで再シミュレーションして容易にど

のような状況をもたらされるかを知ることが可能な点がこの方法の強みである。すべての遺伝子を対象に削除を行うことや、多重遺伝子の削除を行うこと、など、実験では多くの労力や時間がかかることを同じ条件で大量に行うことが可能となる。また、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) などの代謝データベースの情報を取り込んで、用いる細胞が持たない種類の既知の遺伝子をデータ上で細胞に導入することは新たな反応を *in silico* プラットフォーム上に加えることを意味しており、本来その宿主が合成経路を持たない物質の生産可能性を考えてみる事が可能である。

¹³C 標識を用いる代謝フラックス解析と細胞評価

前項までに述べた方法に基づいて、遺伝子操作を行って細胞を構築できた際には、その細胞を評価する必要がある。本項では、実際に遺伝子改変された細胞の代謝状態がどのようになったかを評価する方法について述べる。代謝反応は複雑であり、可逆反応が存在したり、同じ代謝物質に到達するにも色々な経路が存在したりする。たとえば、グルコースが解糖経路を通してグリセルアルデヒド-3-リン酸 (GAP) になったのか、ペントースリン酸経路を経由して、同じ物質に到達したのかは細胞が消費したり排出したりする代謝物質の増減や変化を観察しているだけではわからない。しかし、安定同位体 ¹³C で標識された化合物を栄養源として細胞に取り込ませ、その ¹³C 標識がどのような代謝物にどの程度濃縮されているかを測定することで、どの経路が活性化されているかを知ることができる。

この方法をシステマティックに行う概要を示したものが図4である。¹³C 標識された化合物を取りこませ、培養を行い、濃縮度が定常に落ち着いたところで、細胞から代謝物質を抽出し、その ¹³C 標識濃度をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS)、キャピラリー電気泳動

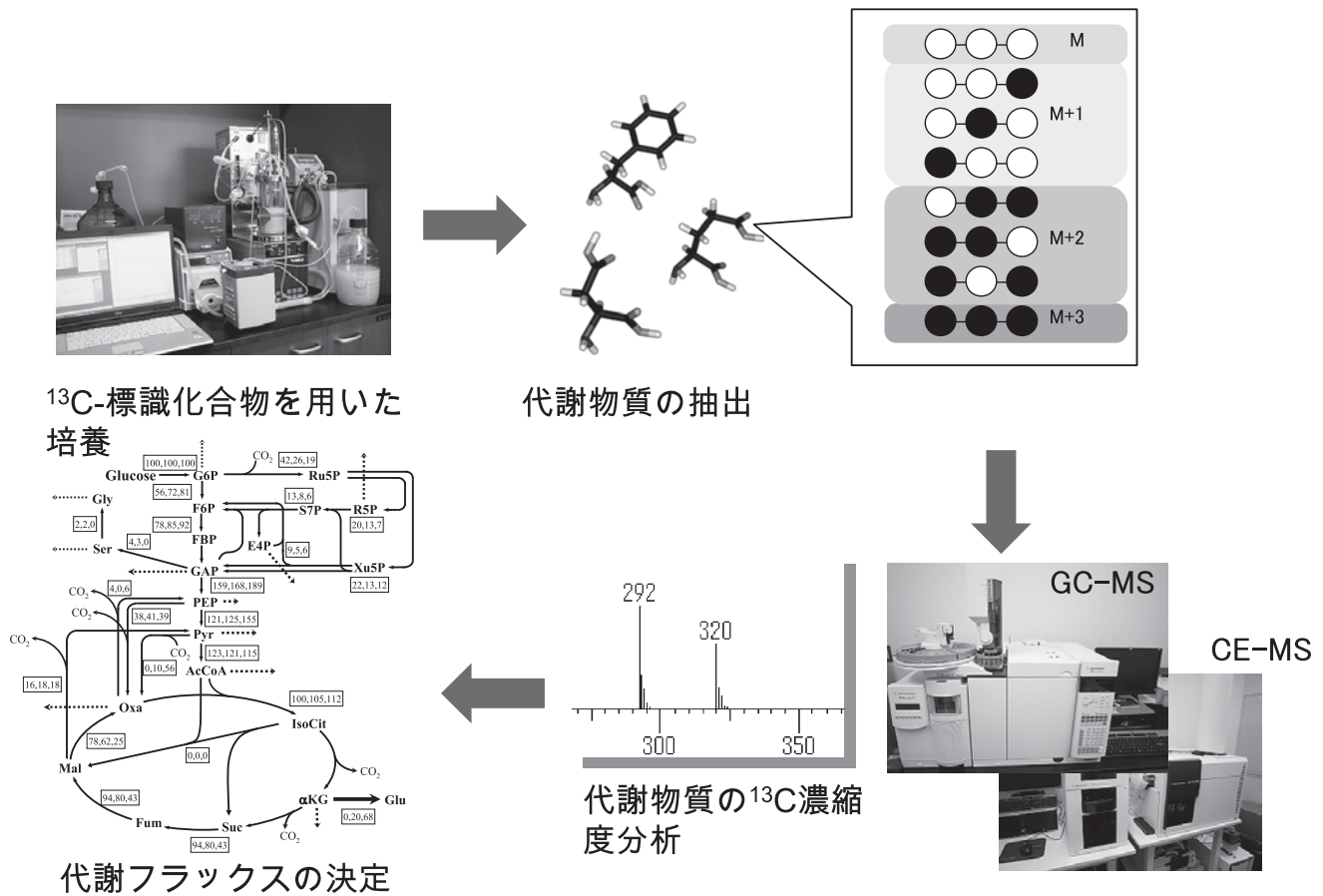


図4. ¹³C標識を用いる代謝フラックス解析方法の概要

質量分析計 (CE-MS), 液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) など分離装置と同定定量分析装置を用いて定量化する。得られた¹³C標識濃縮度をもっともよく説明する代謝フラックス量をコンピュータで決定する。この方法では、(5)式の代謝分子の物質収支に加えて¹³C標識炭素原子の物質収支からの数理モデル化をすることで、代謝フラックスと¹³C標識濃縮度の関係を解析しているのである。

図5にコリネ型細菌の代謝フラックス解析結果を示す。この代謝フラックスは、Tween 40を用いて誘導したグルタミン酸発酵における代謝フラックスの変化である。各反応経路に記述されている数値は増殖期、増殖期と生産期の間、生産期の3つの培養フェーズにおける代謝フラックスを示している。それぞれの代謝フラックスはグルコースの取込み速度を100として規格化して表現している。図からわかるように複雑な経路を含んで代謝フラックスは決定されていることがわかる。グルタミン酸はTCAサイクルのメンバーである2-ケトグルタル酸(αKG)からワンステップで生成する。グルタミン酸を

高度に生産するための一つの鍵として、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) やピルビン酸 (Pyr) からオキサロ酢酸 (Oxa) への補充経路が重要であることが知られている。つまり、TCAサイクルはアセチルCoAから二原子の炭素を供給するがサイクルを一回りする間に二酸化炭素を二分子排出するために、TCAサイクルを活性化するだけではグルタミン酸という余剰代謝分子を生み出すことはできない。これを過剰生産するには補充経路を用いて分子をさらに供給する必要がある。図5からわかるように、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) やピルビン酸 (Pyr) からオキサロ酢酸 (Oxa) への補充経路は逆反応を含め3つも存在するためにどの経路が重要なのかを解明する必要があった。

この解析から、Tween 40を用いて誘導したグルタミン酸発酵においてPyrからの補充経路がグルタミン酸生成に伴って大きく変化していることが分かる。PEPからの経路は増殖期から比較的大きなフラックスを持つがグルタミン酸生産に連動して変化してはいない。また、OxaからPEPへの逆反応はほとんど働いておらず、この経

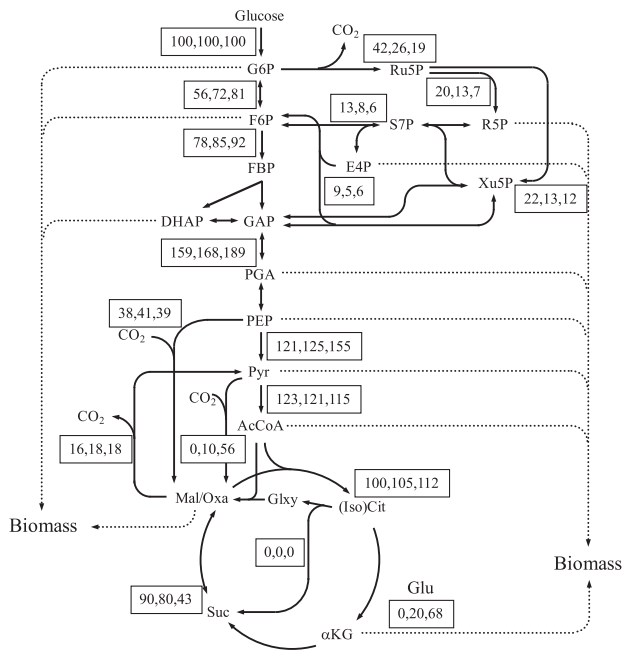


図5. コリネ型細菌の中核代謝経路のグルタミン酸発酵における代謝フラックス。増殖期、増殖期と生産期の間 (Tween40 添加直後)、生産期 (Tween40 添加後の生産期) の3つの培養フェーズにおける代謝フラックスを示している。それぞれの代謝フラックスはグルコースの取込み速度を100として規格化して表現している。

路を削除するような労力を払う必要はないことがわかる。この結果はPyrからの補充経路を触媒する反応を担っている遺伝子を削除するとグルタミン酸生産に影響することから遺伝子レベルでも解明されているが、本手法は、遺伝子を削除して生命の機能を解明するという方法ではなく代謝レベルで非破壊的に重要な経路を特定したという意味で意義が大きく、今後、色々な細胞工場を創製した際の評価系として利用価値が高いと考えられる^{6,7)}。

今後の展開

今まで見てきたように、ミクロからマクロにいたる生命現象を物質収支という概念を使って記述し、発酵槽の

設計、操作、育種の戦略、細胞の評価に用いることができることを見てきた。今後、どのように生命現象のモデル化は発展を遂げるだろうか。

階層を跨ぐ巨大ネットワークの記述

遺伝子、タンパク質、代謝、細胞の生命現象は階層を跨いだ巨大ネットワークのダイナミクスの結果として表現されるべきであろう。遺伝子の発現量変化の伝播による代謝反応ネットワークの変化 (インパクト) の大きさが予測されて始めて、遺伝子操作に予測を与える技術が開発されたといえよう。この分野は代謝制御解析 (Metabolic Control Analysis (MCA))²⁾ と呼ばれ、古くから基本的な考え方は提唱されてきたが、細胞レベルでの各階層の正確なデータが揃わないことなどから、理論と実験をつき合わせる解析が難しいという状況が続いてきた。

我々のグループでは、特定の遺伝子の発現量を加える薬剤によって変化させ、その都度フラックスを解析することで代謝ネットワークのフラックス分布に与える影響を定量的に解析することに成功した⁸⁾。今後、遺伝子の発現や代謝フラックス解析を基盤にして研究が進められると考えられる。これらの方法は、目的物質の生産速度の向上のための分子育種に対して新しい地平をもたらすと考えられる。

文 献

- 1) 合葉ら：生物化学工学。東京大学出版 (1973)。
- 2) ステファノポーラスら：代謝工学。東京電機大学出版 (1992)。
- 3) Palsson, BØ. Systems Biology: Properties of Reconstructed Networks. Cambridge University Press, New York (2006)。
- 4) Shinfuku, Y. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **8**, 43 (2009)。
- 5) Ohno, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 211 (2012)。
- 6) Shirai, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 413 (2006)。
- 7) Shirai, T. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **6**, 19 (2007)。
- 8) Hirasawa, T. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **11**, 87 (2012)。