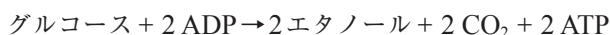


代謝シミュレーションやるなら今でしょ.

松田 史生

微生物細胞内にどのような代謝経路を構築すれば新規有用物質の生産が可能なのか? どの代謝反応を宿主から削除すれば目的物質の生産性を向上できるのか? という代謝工学の基本的な問いに、計算機シミュレーションが有力な手がかりをもたらすようになってきている。シミュレーションというと、難解な微分方程式の乱舞を思い浮かべてしまうが、広く活用されているフラックスバランス解析法 (flux balance analysis, FBA) はミカエリスメンテン式や代謝中間体濃度、フィードバック制御などを無視して (つまり反応速度式の乱舞はなし)、化学量論だけに着目して代謝フラックス分布や有用物質生産能の予測を行う、シンプルかつパワフルな手法である¹⁾。

では、化学量論だけで代謝はどのくらい理解できるのだろうか? 微生物は炭素源を資化する過程で生じるエネルギー (ATP) を用い、代謝中間体からアミノ酸、核酸、脂質などのビルディングブロックを合成し、そこから菌体を組み立てて増殖する。たとえば、嫌気条件下の酵母ではグルコースを解糖系で分解し、ピルビン酸、NADHとATPを生成する。エネルギー源であるATPを連続して得るために、NADHを用いてピルビン酸をエタノールへと変換して菌体外へ排出することで、酵母は不要なピルビン酸の排出と、解糖系の反応に必要なNAD⁺の再生を一気に実現している。



このように、酵母のエタノール生産は基質レベルでも、酸化還元バランスでも収支が合い、かつ菌体維持のためのエネルギーも確保できて大変都合がよい。つまり、我々が目指している「目的物質の効率的な生産」とは「微生物内で目的物を大量生産した方が全体として増殖に都合がよい状態を作ること」であり、それは化学量論のみでも議論が可能である。

FBAにもとづく代謝シミュレーションでは、まず、全代謝反応の化学量論式を集めた代謝モデルを用意する。ついで、炭素源からアミノ酸、核酸、脂質を合成する経路を流れる代謝物量を調節して、もっとも多くの菌体を組み立てられる (増殖が最大となる) 代謝フラックス分布を求める。手法の詳細は文献²⁾を参照されたい。代謝モデルには「酸素や栄養源の取り込み量」や「発酵産物の培地への排出」も加味されているので、通気条件や栄養条件が目的物の収率に及ぼす影響を予測できる。近年は、ゲノム情報をもとに代謝反応を網羅したゲノムスケール代謝モデルの構築が50種を超える有用微生物

で行われている。たとえば大腸菌の最新モデルは1366遺伝子の情報を反映した1136代謝物、2251反応からなるが、このような大規模なモデルでも1回のシミュレーションに必要な計算時間は数秒であり、さまざまな検討を容易に実施できる。大腸菌や枯草菌のモデルを用いた検証では、異なる炭素源での増殖速度の予測値が実験値とほぼ一致し、1遺伝子破壊株の表現型 (増殖能) を95%以上の精度で予測できた³⁾。また、コリネ型細菌のモデルで予測した有機酸の生産量や、菌体内代謝フラックス分布は実験値とよく類似していた⁴⁾。これらの結果は本法が実用レベルの予測力を持つことを示している。

FBAにもとづく代謝シミュレーション法では、代謝の改変が目的物質の生産に及ぼす影響を簡単に予測できる。たとえば新規代謝反応の導入は、該当する反応の化学量論式を代謝モデルに書き加えるだけで再現できる。目的物を合成可能な2つの経路のうち、より生産性が良い方を選んだり、導入する酵素遺伝子の補酵素特異性 (NADPH型かNADH型) を検討したりできる。また、代謝モデルから任意の反応式を消去することで、遺伝子破壊による代謝経路の削除も再現できる。これを全代謝反応についてくり返し行くと、目的物の高生産に寄与が大きい破壊遺伝子の候補リストが得られる。たとえば、大腸菌のモデルを用いて遺伝子破壊の組合せがコハク酸生産能に及ぼす影響を網羅的に調べたところ、ピルビン酸キナーゼをコードする遺伝子を破壊した $\Delta ptsG \Delta pykAF$ 株で生産量が最大化すると予測された。実際に作成した代謝改変株はコハク酸生産量が非破壊株に比べて約4倍向上した⁵⁾。他にも代謝シミュレーションを利用した代謝デザイン成功例は有機酸、水素、アルコールなどで数多く報告されている¹⁾。FBAにもとづく代謝シミュレーションは、フィードバック阻害を加味できない、収率は予測できても生産速度はわからないなどの限界があり、なんでもわかる打ち出の小槌ではないが、諸外国では代謝経路を設計するための便利ツールとして広く活用されている。日本生物工学会代謝工学研究部会では、技術交流会の実施を通じて本法の普及に努めており、我が国が得意とするものづくり技術と組み合わせることで、予想もつかない多彩な応用へとつながることが期待される。

- 1) McClosky, D. *et al.*: *Mol. Sys. Biol.*, **9**, 661 (2013).
- 2) 清水 浩: 生物工学会誌, **91**, 712 (2013).
- 3) Oh, Y. K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **282**, 28791 (2007).
- 4) Shinfuku, Y. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **8**, 43 (2009).
- 5) Lee, S. J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7880 (2005).