

代謝シミュレーションによる 細胞内代謝のデザインと工学的応用

松田 史生*・吉川 勝徳・清水 浩

微生物発酵で生産できる有用物質を多様化し、さらにその収率を可能な限り向上させていくには、微生物の代謝機能を大がかりに改変することが求められる。微生物の代謝機能そのものがブラックボックスの部分が多く残していることもあり、これまでは研究者の経験やアイデアをもとに試行錯誤的な遺伝子破壊などの改変が行われてきた。一方、電子、機械などの他工学分野で、新たなデバイスを設計図なしのまま行き当たりばったりで開発することは考えられない。要求されるスペックをもっとも効率よく達成可能な設計が、計算機シミュレーションなどを駆使しつつ追求される。物理法則に基づく計算機シミュレーションで設計中のデバイスの性能を予測できれば、設計の変更が性能に及ぼす影響を実際の試作以前に把握することが可能となる。また試作機の性能とシミュレーション結果を比較検討することから、初期設計の問題点の絞り込みを迅速に行えるだろう。

近年になって、微生物代謝工学分野においても効率的な代謝経路の「設計図」をデザインする必要性が強く認識されるようになってきている。もし、ゲノム情報、生化学、分子生物学などの知見を計算機中に集約し、微生物代謝を再現することができれば、代謝工学におけるさまざまな課題、どのような代謝経路を他の生物から移植すれば新規の代謝経路を構築することが可能なのか？どのような遺伝子をホストの細胞から削除すれば収率や目的物質の生産性を向上させることができるのか？などの検討が可能となり、合理的な代謝経路のデザインへと応用できるだろう。しかし、微生物代謝というきわめて複雑な生物プロセスを計算機中に再現し、実用に足るシミュレーションは可能なのだろうか？フラックスバランス解析 (flux balance analysis, FBA) にもとづく代謝シミュレーション法は、大胆な簡略化で複雑性の問題を回避し、代謝工学分野で広く利用されている実用的な手法である¹⁾。本稿ではその原理と応用例について概説する。

フラックスバランス解析 (FBA)

代謝を計算機で再現するには、代謝反応を計算可能な

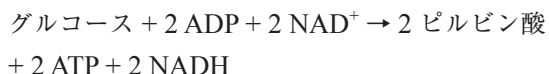
式で記述する必要がある。そこで生物物理あるいはシステムバイオロジー分野では、化学量論、反応速度論、熱力学をすべて加味した代謝の計算機シミュレーションが試みられてきた。代謝中間体濃度と酵素量から代謝経路を流れる代謝流量 (フラックス) をミカエリスメンテン式などで計算し、代謝物濃度の経時変化を再現する。本法は各代謝酵素量や、フィードバック制御が目的物質の合成フラックスにどのように影響するかという、制御レベルでの解析が可能となるため、その実現が期待されている。しかしミカエリスメンテン定数などのパラメーターを全反応についてそろえることがネックとなっており、代謝設計に応用可能なレベルの予測力を持つには、さらなる進展が必要とされている。

一方、フラックスバランス解析 (FBA) は1990年代からカリフォルニア大学サンディエゴ校のPalssonらによって開拓されてきた代謝シミュレーション法である²⁾。本法の最大の特徴は、代謝中間体濃度、酵素量、フィードバック制御などの反応速度論、熱力学に関わる要素を大胆に捨象 (無視) し、化学量論と代謝流量 (フラックス) だけに着目している点にある。化学量論式とはいわゆる代謝マップに集約された反応式 (例、ヘキソキナーゼ: $\text{グルコース} + \text{ATP} \rightarrow \text{グルコース-6-リン酸} + \text{ADP}$) に他ならない。つまり、ある生物の代謝マップさえ用意できれば、その代謝マップ中を流れる代謝フラックスを予測可能にするのが、FBAの最大の特徴である。

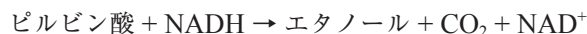
化学量論による代謝の理解 では、代謝を化学量論だけでどこまで理解できるのだろうか。微生物は菌体外から取り込んだ炭素源 (グルコースなど) を解糖系やTCAサイクルを通じて水と二酸化炭素まで分解する。その過程で生じる還元力をNADHとして、熱エネルギーをATPとして固定する。また、中心代謝中間体からアミノ酸、核酸、脂質などを経て、タンパク質、複合脂質、DNA、RNAなどの菌体構成成分を合成して菌体を増殖する。微生物にとって、高い増殖能は自然環境で生き残っていくためにもっとも重要な性質であることを考えると、微生物は増殖にとって役に立たないことはあまりし

* 著者紹介 大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻 (准教授) E-mail: fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

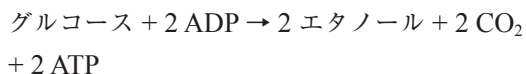
ないと推定するのは妥当だろう。つまり、増殖に都合がよい場合に、アルコールや酢酸などを菌体外へ積極的に排出する。たとえば、嫌気条件下の酵母では、グルコースを解糖系でピルビン酸まで分解して2分子のNADHとATPを生成する。



これを連続して進めるには、生成物を消費しなくてはならない。酵母はATPを増殖のエネルギー源として利用しつつ、ピルビン酸を脱炭酸し、さらにNADHを用いてエタノールへと還元してから、菌体外へ排出することで、不要なピルビン酸の排出と、NAD⁺の再生を一気に実現している。



二つを合わせると、酵母における嫌気発酵を表す化学量論式となる。



このように、酵母のエタノール発酵は基質レベルでも、酸化還元バランスのレベルでも全体として収支が合い、かつ菌体維持のためのエネルギーも確保できる大変都合がよい状態である。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議論が可能なのことがわかる。

FBAにもとづく代謝シミュレーション

代謝モデル FBAにもとづく代謝シミュレーションは、このような解析を全代謝反応を加味した代謝ネットワークに対して行う。上記では複数の反応をまとめた式を用いたが、実際の解析では代謝マップを構成する100–2000反応の化学量論式を束ねた「代謝モデル」が対象となる。最近では、微生物ゲノム情報をもとに全代謝反応を列挙したゲノムスケール代謝モデルを作成することが可能となっている。代謝モデルには後述する菌体合成式と、中心代謝、エネルギー代謝に加え、菌体を構成するタンパク、DNA、複合脂質などの合成に必要な

アミノ酸、核酸、脂質といったすべての構成要素を合成する反応が含まれている。

目的関数 FBAでは目的関数という概念を導入することで、代謝フラックス分布のシミュレーションを実現している³⁾。上記の議論に出てきた「微生物は増殖にとって役に立たないことはあまりしない」とは「微生物の代謝フラックス分布は増殖が最大となるように最適化されている」と言い換えることができる。Palssonらはこれを化学量論の枠組みで表現するために、菌体合成式という仮定の反応（目的関数）を想定した。これは、必要量のアミノ酸、核酸、脂質とATPから、1gの菌体を合成する化学量論式である。そこで、グルコースからアミノ酸、核酸、脂質、およびATPに至る代謝反応のフラックスを、菌体合成式が最大となるように最適化することで、微生物内の代謝フラックス分布を求めるのが、FBAにもとづく代謝シミュレーション法である。

定常状態 FBAでは代謝フラックス分布を予測する際に、代謝が定常状態にあると仮定する。定常状態とは、細胞中の代謝中間体量と代謝フラックスが時間変化せず一定にある状態、すなわち「前の反応の生成物を次の反応で全量消費しなくてはならない状態」である。この仮定は、代謝モデルの数学的な取り扱いを容易するために導入された。常に一定の状態にあるとは、逆に言うと時間変化しない状態にあることになる。これは、FBAが反応速度にかかわる代謝中間体濃度、酵素量などをすべて無視した解析であることを反映している。ケモスタット培養や、対数増殖期にある細胞はおおよそ代謝定常状態にあると考えられていることから、非現実的な仮定とは言えない。しかし、多くの計算機シミュレーションでは系の時間発展が取り扱われることから、直感的に理解しにくい仮定であることも事実である。

このようにFBAは化学量論だけに着目し代謝を静的に解析する。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、炭素源の違い、通気条件、代謝反応の有無が、ターゲット化合物の生産収率に及ぼす影響を解析できる。一方、化学量論では表現できない代謝の動的な側面は加味できない。たとえば、酵素量の変化（酵素遺伝子の過剰発現など）、フィードバック制御の影響、培養温度の影響、発酵の時間変化、さらにはターゲット化合物の生産速度は解析できない。このように多くの制約があり、万能なシミュレーション法とはいえないが、FBAのできることを最大限に生かすことで、さまざまな代謝工学への応

用が行われている。

フラックスバランス解析の工学分野への応用

代謝シミュレーションの実行環境 FBAを簡単に実行するための専用ソフトウェアはいまのところ市販されていない。数値計算ソフトウェアMatlab (Mathworks社製) 上でOpenCOBRA (COstraints Based Reconstruction and Analysis) Toolboxという無償ツール群を用いるのがデファクトスタンダードとなっている^{4,5)}。コマンドライン上で代謝モデルの読み書きやシミュレーションの実行を行うとつきの悪さが、バイオ系研究者にとっての最初の障壁とみなされている。しかしながら、筆者らの担当する大学院講義で上記ツールを用いた代謝設計の演習を実施したところ、受講生は簡単なレクチャーの後で容易に使いこなしていたことからみても、実はそれほど高い障壁ではないのかもしれない。また、最近になってFBAを解説した日本語の文献も増えてきた^{6,7)}。さらに日本生物工学会代謝工学研究会では、産学の研究者を対象に代謝シミュレーション法の講習会を実施しており、本法を代謝工学研究に導入する下地が整いつつある。

代謝モデルの準備 FBAでは上記の全代謝反応の化学量論式と菌体合成式を組み合わせたものを代謝モデルとよぶ。これまでに大腸菌 (*Escherichia coli*)、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をはじめとする50を超える生物種の代謝モデルが世界中の研究グループで構築、配布されている。その数は日々増え続けており、産業上有用な微生物はほぼ網羅されていると言えるだろう⁸⁾。

代謝モデルの作成は大きく、(1) 全ゲノム解読、(2) アノテーション、(3) 代謝反応の収集、(4) 菌体構成成分の分析、(5) ドラフト代謝モデルの構築、(6) 代謝モデルのブラッシュアップ、の項目から成る。ゲノム解読済みの生物種については、KEGGやMetaCycなどのデータベースから代謝反応を収集できる。また、ゲノム情報から、自動的にドラフトモデルを構築するソフトウェアも開発されている⁹⁾。(6)では、アノテーションの訂正、文献情報に基づく反応の付与など地道に情報を収集し、代謝モデルを改善する。代謝モデルの作成は経験があったとしても2か月、未経験であれば1年程度時間がかかる。そのため、対象生物の近縁種の代謝モデルが公開されていれば、それを基盤に、代謝反応の差異を反映し、代謝モデルを作成することも一つの手段である。

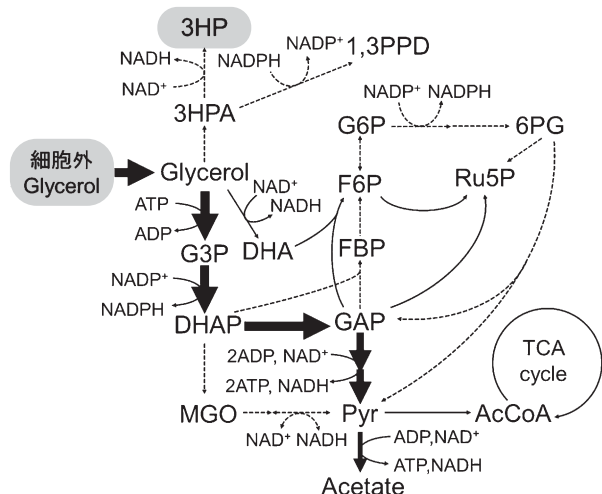
たとえば大腸菌の最新代謝モデルは1366遺伝子の情報を反映した1136代謝物、2251反応からなる大規模も

のであるが、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、容易に代謝シミュレーションが実行可能である。われわれもコリネ型細菌、シアノバクテリアの国産ゲノムスケール代謝モデルを独自に構築し、代謝設計へと利用してきた^{10,11)}。たとえば、コリネ型細菌のゲノムスケール代謝モデルを用い、グルコースの取り込みに対して酸素の供給をさまざまに変化させた条件でシミュレーションを行い、予測した乳酸、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見いだした¹⁰⁾。すなわち、与えられた環境状態下での微生物の物質生産能力を予測可能であることを実証した。酸素供給が十分な場合は解糖経路やTCAサイクルが活性化され細胞は盛んに増殖するのに対し、酸素供給がグルコース消費に対して小さくなると、生成したNADHをNAD⁺に戻すバランスを保つために有機酸を生成するといった、代謝フラックス解析により実験的に明らかにされた代謝の変動を、シミュレーションでも再現可能であることを示した。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系(増殖能)を95%以上の精度で予測できた¹²⁾。これらの結果はFBAにもとづく代謝シミュレーションは実用レベルの予測力を持つことを示している。

FBAを用いた代謝設計 目的物の生産効率を向上させるために、不要な代謝反応に関わる複数の遺伝子の欠損が試みられている。しかし、実験的にすべての遺伝子破壊の組合せを調べることは困難である。FBAでは、任意の反応式を消去した代謝モデルを用いてシミュレーションを行うことで、反応の削除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、バイオポリマー原料となる3-ヒドロキシプロピオン酸(3HP)を過剰生産する大腸菌の育種に向け、グリセロールから図1Aのような経路を導入することにした。大腸菌のゲノムスケール代謝モデルにこれらの代謝反応を加えた改変モデルを作成し、代謝シミュレーションを実施しても3HPの生産はおこらなかった。そこでゲノムスケール代謝モデルから2反応を除いたものを網羅的に作成して3HP生産能を予測したところ、*tpiA*および*zwf*がコードする反応を除いたときにもっとも高い3HP生産能を示した(図1B)。この代謝デザインを元にして実際に*tpiA*、*zwf*破壊を追加導入した改変株では、0.20 mol/mol-glycerolの収率で3HPを生産した¹³⁾。

またコハク酸生産大腸菌株のモデルを用いて、遺伝子

(A) 3HP生産経路導入モデル



(B) *tpiA*, *zwf*追加破壊株

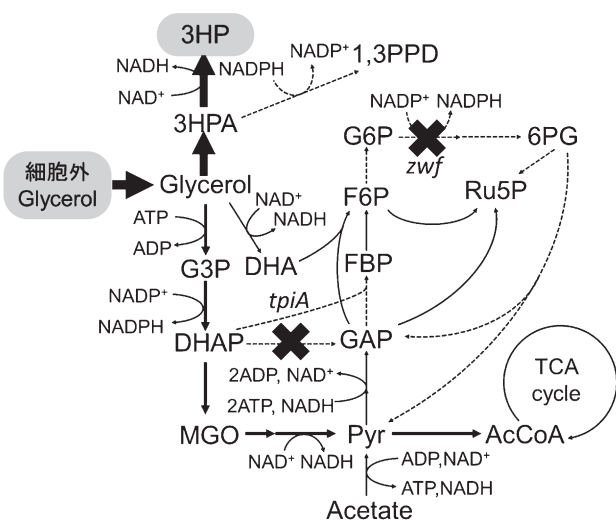


図1. 3-ヒドロキシプロピオン酸(3HP)生産大腸菌の代謝シミュレーション結果。反応の矢印の太さが代謝フラックス量を示している。(A) グリセロールから3HPを生産する経路の導入株のシミュレーション結果。(B) *tpiA*, *zwf*追加破壊株のシミュレーション結果。

破壊の組合せが生産能に及ぼす影響を網羅的に調べたところ、*AptsGΔpykAF*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¹⁴⁾。代謝シミュレーションを利用した代謝デザインの成功例は、他にも有機酸、水素、アルコールなどで数多く報告されている¹⁾。諸外国では微生物育種法のスタンダードとして広く活用されている。

FBAにもとづく代謝シミュレーションをより活用する試みとして、さまざまな計算手法の開発がすすめられている。3HPの例でも示したように目的物質の高生産

に向けた多重破壊遺伝子の探索に代謝シミュレーション法は有用である。しかし、破壊する遺伝子数 n の増加に従って、探索すべき組合せ数が n 乗のオーダーで増加するため、従来法では3-4重破壊が計算量的な限界であった。そこで、我々は、シャドウプライスという概念を用いて、効果の期待できない遺伝子を探索対象から除くことで、10重破壊なども可能な計算手法FastProsを開発した¹⁵⁾。

FBAを用いた代謝経路の特性解析 近年大腸菌を宿主として、FBAを駆使した代謝改変を行い、ブタノール、プロパノール、アルカン類、ファインケミカルなどの生産株の育種が報告されている。一方、出芽酵母は発酵過程のさまざまなストレスに耐性があり、経済的な生産を行う宿主として期待されている。しかしながら大腸菌でうまくいった代謝改変をそのまま酵母で行っても期待通りの結果が得られないことが多い。そこで大腸菌と酵母の代謝経路の特性をFBAを用いて比較した。大腸菌の代謝モデルに、1-ブタノール、1-プロパノールなど7種類の高級アルコール生合成経路を追加したモデルをそれぞれ作成した。さらに、順列組合せ的に1-4つの代謝反応を欠損したときの各高級アルコールの生産量を予測したところ、いずれの高級アルコールでも代謝反応の欠損で生産能が向上することが示された。ついで、酵母の代謝モデルを用いて同様の解析を行ったところ、代謝反応の多重欠損を加えると、高級アルコール生産能の向上よりもむしろ、菌体生育速度が著しく減少した。これは、酵母の中心代謝経路がそもそも高級アルコール生産に向いていないことを示唆している¹⁶⁾。そこで、イソブタノール生産酵母に大腸菌の代謝経路を参考にして代謝経路を追加導入したところ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)を細胞質で活性化した酵母株でイソブタノール生産量を2倍以上向上させることに成功した¹⁷⁾。このようにFBAを用いることで、あらたな代謝経路のデザイン戦略を見出すことが可能となる。

代謝フラックス解析による検証 代謝シミュレーション法で作成したデザインをもとに、代謝改変微生物を構築しても、予測通りの収率を発揮することは少ない。これは化学量論以外のさまざまな要因が実際の代謝制御に関わるからである。FBA法では目的物の生産が最大となるときの代謝フラックス分布を調べるのが可能である。そこで、実際に作成した改変株の細胞内の代謝フラックス分布を¹³C代謝フラックス解析で実験的に決定すれば、最適な代謝フラックス分布と比較することで、

さらなる収率向上に必要な問題点を特定することが可能となる。このように、白紙の状態から高効率な代謝経路を設計できるだけでなく、改良途中の微生物株のさらなる改変についても知見をもたらすことができる。

結 言

FBAに基づく代謝シミュレーションは有用物質の高生産を実現可能な代謝経路を設計するためのツールである。目的物質の収率を0%から数十%まで向上させる合理的な代謝デザインをもたらす。ただし、反応速度式、熱力学の枠組みで理解されるべき代謝物濃度、反応の向きなどといった点を捨象しているため、目的物質の収率をさらに向上させるときに考慮すべきフィードバック阻害の有無や酵素量の増減などの影響を解析することは難しい。そこで、化学量論、反応速度論、熱力学を加味した代謝シミュレーション技術の開発に取り組んでいる。また、日本生物工学会代謝工学研究会では、産学の研究者を対象にした技術交流会の実施を通じてFBAにもとづく代謝シミュレーション法の我が国での普及に努めて

いく予定である。

文 献

- 1) McClosky, D. *et al.*: *Mol. Sys. Biol.*, **9**, 661 (2013).
- 2) Orth J. D. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **28**, 245 (2010).
- 3) Feist, A. *et al.*: *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 344 (2010).
- 4) Schellenberger, J. *et al.*: *Nat. Protoc.*, **6**, 1290 (2011).
- 5) The openCOBRA project: <http://opencobra.sourceforge.net/openCOBRA/>
- 6) 清水 浩: 生物工学会誌, **91**, 712 (2013).
- 7) 松田史生ら: 生命システム工学, p. 147, 化学同人 (2012).
- 8) In silico organisms: <http://systemsbiology.ucsd.edu/InSilicoOrganisms/OtherOrganisms>
- 9) Karp, P. D. *et al.*: *Brief Bioinform.*, **11**, 40 (2010).
- 10) Shinfuku, Y. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **8**, 43 (2009).
- 11) Yoshikawa, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92**, 347 (2011).
- 12) Oh, Y. K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **282**, 28791 (2007).
- 13) Tokuyama, K. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **13**, 64 (2014).
- 14) Lee S. K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7880 (2005).
- 15) Ohno, S. *et al.*: *Bioinformatics*, **30**, 981 (2013).
- 16) Matsuda, F. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **10**, 70 (2011).
- 17) Matsuda, F. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **12**, 119 (2013).