



In silico screening of triple reaction knockout *Escherichia coli* strains for overproduction of useful metabolites

大腸菌による有用物質生産に向けた3重反応破壊の *in silico* スクリーニング

(JBB, Vol. 115, No. 2, 221–228, 2013)

大野 聡¹・古澤 力^{1,2}・清水 浩^{1*}

微生物にターゲットとする有用物質を高効率で生産させるには、ホストとなる微生物に遺伝子操作を加え、生産に適した代謝ネットワークを細胞内で構築することが重要である。では、大規模で複雑な代謝ネットワークの中で、どの遺伝子を操作すればいいか、計算機を用いて見つけ出すことができないであろうか？必要な遺伝子操作を簡単かつ正確に予測する方法があれば、実験に必要なコストを削減し、ターゲット物質の生産性の高い菌株を効率よく育種することが可能となる。

近年、微生物のゲノム情報を用いて、化学量論係数に基づく代謝モデルを計算機上で (*in silico*) 構築し、細胞内の代謝をシミュレートする手法が開発されてきた¹⁾。この手法では、与えられた代謝ネットワークより、時間的に定常で増殖速度が最大となるような代謝フラックス (単位菌体量あたりの反応速度) の分布などが推定される。NADHなどの酸化還元バランスをゲノムワイドで考慮することが可能であり、育種に向けた遺伝子操作の探索に利用されている²⁾。

そこで本論文では、この手法を用いて大腸菌に3種類のターゲット物質をそれぞれ生産させる際に有望な3反応の破壊 (実験的にはその反応をコードする遺伝子の破壊) を探索した。ターゲットとしては、バイオ燃料やポリマー原料となる 1-butanol, 1-propanol, 1,3-propanediol を選択した。ターゲット物質の生合成経路を導入した株を出発点とし、代謝反応を対象に3反応の破壊の全組合せ (約10⁹通り) に対して代謝のシミュレーションを行い、目的物質生産収率の向上が予測される反応破壊、およびその時の代謝フラックス分布を予測した。従来の手法では、3反応の破壊であっても高々10³のオーダーの破壊の組合せを対象とした探索であったが、使用する代謝モデルの縮約を行うことで、予測の正確さを保ちながら、探索範囲の網羅性を格段に向上させることができた。

Glucoseを単一炭素源とし、微好気条件下での培養を想定して、1-butanol生産に向けて反応破壊を探索した結果、表1に示す3重破壊の組合せが見つけ出された。

表1. 1-Butanol生産に向けた3重破壊の予測結果

破壊遺伝子*	収率 [g/g-glucose] (理論最大に対する%)
<i>adhE</i> , <i>pta</i> , <i>tpiA</i>	0.303 (73.5)
<i>adhE</i> , <i>pta</i> , <i>cyoA</i>	0.288 (70.0)
<i>adhE</i> , <i>pta</i> , <i>nuoN</i>	0.286 (69.6)
(None)	0.000 (0.0)

*破壊された反応をコードする代表的な遺伝子

高い生産収率が予測される破壊の組合せでは、acetyl-CoAからのethanolとacetate合成に関わる、*adhE* 遺伝子と *pta* 遺伝子の破壊が共通していた。導入した *Clostridium* 属由来の1-butanol生合成経路では、NADHの還元力を利用し、acetyl-CoAより1-butanolが合成される。そのため、*adhE*, *pta* 遺伝子が破壊されると、解糖系やTCA cycleで生じたNADHを再酸化するため、NADHの酸化を伴う1-butanol生産が促進されると予測された。この *adhE*, *pta* 遺伝子の破壊は、現実の系でも1-butanol生産性向上に寄与することがすでに報告されており³⁾、現実的な予測がなされていると考えられる。一方で、残りの *tpiA*, *cyoA*, *nuoN* 遺伝子の破壊が1-butanol生産へ及ぼす影響は報告がなく、新規破壊遺伝子候補として実現が期待される。また、1-propanolや1,3-propanediolをターゲットとした場合や、glycerolを炭素源とした場合についても、同様に有望な破壊遺伝子を見つけて出すことに成功した。

本論文の手法は、ゲノムの解読された微生物に対して汎用的に用いることが可能であるため、今後、代謝デザインを合理的に行う手法の基礎として、さまざまな発酵生産、微生物代謝解析に広く用いられることが期待される。

- 1) Feist, A. M. *et al.*: *Mol. Syst. Biol.*, **3**, 121 (2007).
- 2) Tokuyama, K. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **13**, 64 (2014).
- 3) Atsumi, S. *et al.*: *Metab. Eng.*, **10**, 305 (2008).

*著者紹介 ¹大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻 (教授) E-mail: shimizu@ist.osaka-u.ac.jp
²理化学研究所生命システム研究センター