

# 代謝工学の創成と発展—代謝解析とオミクス研究との融合

清水 浩<sup>1\*</sup>・古澤 力<sup>1,2</sup>・平沢 敬<sup>1</sup>・吉川 勝徳<sup>1</sup>  
小野 直亮<sup>3</sup>・戸谷 吉博<sup>1</sup>・白井 智量<sup>4</sup>

代謝工学は1990年代に生物の代謝を定量化することにより解析し、経験やランダム変異に基づいて行われてきた微生物育種やプロセス開発に大きな変革をもたらした。微生物代謝経路の最適化と頑強性を持った細胞の創製を合理的に設計し生物機能を最大限発揮させる方法の開発が行われてきた。また、今日ポストゲノム時代において、ゲノム解析に基づく変異過程のトレース、細胞内の遺伝子発現や代謝物質量の網羅的解析技術の開発など、オミクス研究と代謝解析が融合することにより、代謝工学は大きく発展してきたといえる。

本稿ではゲノムスケールの代謝モデルに基づく微生物代謝設計、<sup>13</sup>C同位体標識による代謝フラックス解析に基づく細胞の代謝評価について筆者らの研究を中心に代謝工学の発展について述べる。

## 代謝工学の創成と発展

代謝を定量的に記述し、解析しようという研究は古くからあり、1970年代にはすでに日本の生物化学工学分野の研究者が代謝の記述を試みている<sup>1)</sup>。また、アミノ酸、核酸発酵を中心に優れた形質をもつ微生物のスクリーニングや変異育種による代謝の最適化、さらには遺伝子工学技術による細胞改良により非常に多くの工業微生物の創製が成功しており、今日までの発酵産業を支える基盤を形成してきた<sup>2)</sup>。

代謝工学という言葉は、1989年にStephanopoulos<sup>3)</sup>とBailey<sup>4)</sup>がScience誌に代謝工学の概念を提唱した際に初めて用いられた。生物の代謝をシステムとして記述し、標的の物質生産を向上させることを最終目的に、1) 代謝の状態を定量的に解析する代謝フラックス解析<sup>5)</sup>、2) ゲノムレベルで代謝を予測するフラックスバランス解析 (FBA)<sup>6)</sup>、3) 代謝に与える摂動のインパクトの大きさを解析するメタボリックコントロール解析 (MCA)<sup>7)</sup>、などの方法が次々と開発され、大きな成果を上げてきた。また、これらの考え方をまとめた総説<sup>8)</sup>、教科書<sup>9,10)</sup>が現在までに発表されている。標的物質生産向上を目的として合理的な設計指針を与える方法論として大きく発展してきたといえる。

2000年以降、ポストゲノム時代に入るとともに、ゲノム情報を基盤に微生物の代謝最適化を行うゲノムブリーディング、代謝をよりゲノムワイドに解析するゲノムスケールモデルの利用<sup>11)</sup>、トランスクリプトーム

解析からの有用遺伝子の探索、遺伝子発現解析と表現型網羅的解析の相関解析<sup>12)</sup>、メタボロミクスデータに基づく高精度代謝フラックス解析<sup>13)</sup>などへ研究は展開してきている。

## ゲノムスケールの代謝モデルに基づく微生物代謝設計

用いる細胞のゲノム情報が明らかになり、その細胞の持つ代謝反応が分かれば、細胞の代謝反応全体を数式として記述できるようになる。この数式モデルを用いると、遺伝子の削除、導入の結果各代謝フラックスがどのような値を示すかを「細胞は与えられた環境下で細胞増殖を最大にするように代謝を自己組織化する」という仮定のもとでの線形システムの最適化問題として解く事が可能である。図1に代謝シミュレーションのイメージを示す。

筆者ら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り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生産のシミュレーションの値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<sup>14)</sup>。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な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。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る。ゲノムスケールの代

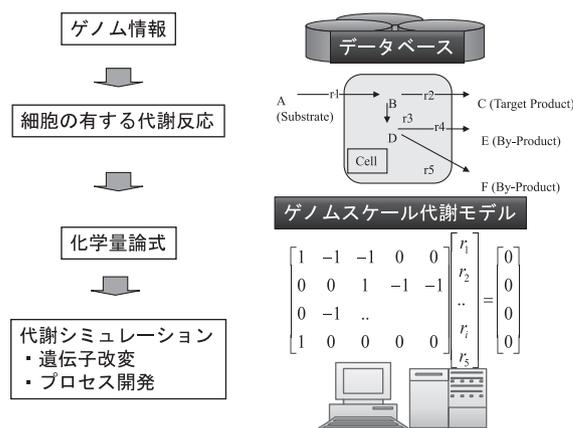


図1. ゲノム情報に基づく代謝シミュレーション

\* 著者紹介 <sup>1</sup>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

<sup>2</sup>理化学研究所生命システム研究センター, <sup>3</sup>奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科,

<sup>4</sup>理化学研究所バイオマス工学研究プログラム

謝モデルはゲノムが明らかになった生物数の上昇とともに多くなっており、現在、100種程度の生物のゲノムスケールの代謝モデルが発表されている。また、遺伝子削除、生産最適化をデザインする方法も多く提案されている。今後、目的物質の生産を行うための手法として大きくその発展が見込まれている。

### <sup>13</sup>C 同位体標識による代謝フラックス解析

前項までに述べた方法に基づいて細胞を構築した際に、構築された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な

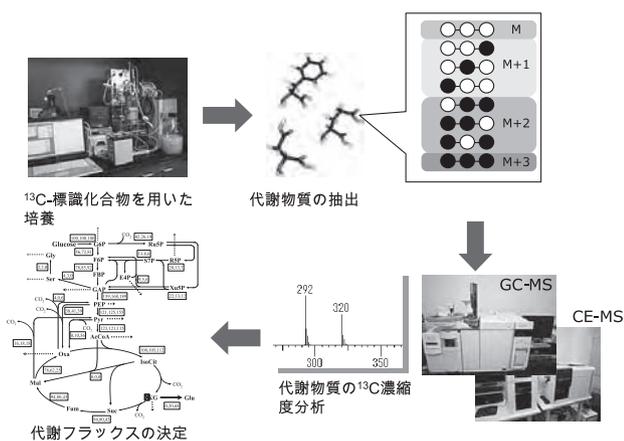


図2. <sup>13</sup>C 標識を用いる代謝フラックス解析方法の概要

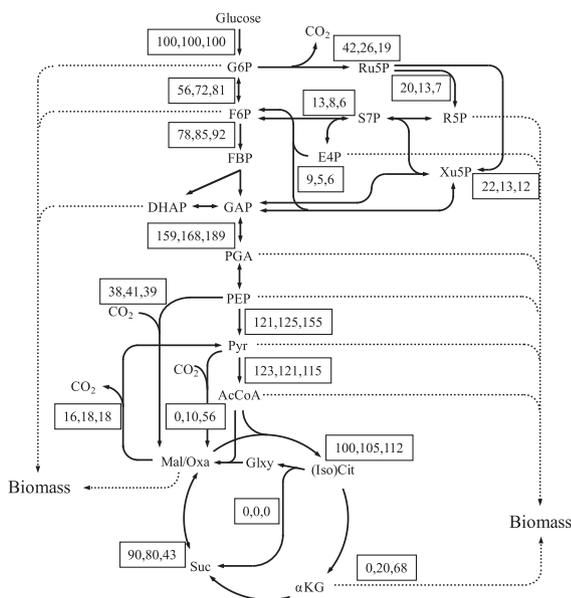


図3. コリネ型細菌の中核代謝経路のグルタミン酸発酵における代謝フラックス。図中の数値は、各々増殖期(左)、増殖期と生産期の間(中央)、生産期(右)の3つの培養フェーズにおける代謝フラックスを示している。それぞれの代謝フラックスはグルコースの取り込み速度を100として規格化して表現している。

たかを実験的に評価する方法について述べる。代謝反応は複雑であり、多くの可逆反応やループが存在し、同じ代謝物質に到達するにも色々な経路が存在する。しかし、安定同位体<sup>13</sup>Cで標識された化合物を細胞に取り込ませ、その<sup>13</sup>C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、どの経路が実際に活性化されているかを知ることができる。

この方法をシステムティックに行う概要を示したものが図2である。<sup>13</sup>C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<sup>13</sup>C標識濃縮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<sup>13</sup>C標識濃縮度を最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。

図3にコリネ型細菌の代謝フラックス分布を示す。この代謝フラックスは、Tween40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り込み速度を100として規格化して表現している<sup>5)</sup>。

このような手法は、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、色々な細胞工場を作成した際の評価系として利用価値が高いと考えられる。

### 文 献

- 1) 遠藤ら：化学工学論文集, **2**, 416 (1976).
- 2) 日本生物工学会編：生物工学ハンドブック, p.49, コロナ社 (2005).
- 3) Stephanopoulos, G. and Vallino, J.: *Science*, **252**, 1675 (1991).
- 4) Bailey, J.: *Science*, **252**, 1668 (1991).
- 5) Shirai, T. et al.: *Microbial. Cell Factories*, **6**(1), 19 (2007).
- 6) Palsson, B. Ø.: *Systems Biology: Properties of Reconstructed Networks*, Cambridge University Press (2006).
- 7) Shirai, T. et al.: *Metabolic Engineering*, **7**(2), 59 (2005).
- 8) Shimizu, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 563 (2002).
- 9) Stephanopoulos, G.ら著(清水, 塩谷訳): 代謝工学—原理と方法論, 東京電機大学出版 (2002).
- 10) Yoshikawa, K. et al.: *Systems Metabolic Engineering – Towards Superior Cell Factories*, p.57, Springer (2012).
- 11) Yoshikawa, K. et al.: *Appl. Microb. Biotechnol.*, **92**, 347 (2011).
- 12) Hirasawa T. et al.: *Appl. Microb. Biotechnol.*, **87**, 391 (2010).
- 13) Toya, Y. et al.: *Bioetchol. Prog.*, **26**, 975 (2010).
- 14) Shinfuku, Y. et al.: *Microbial. Cell Factories*, **8**, 43 (2009).