

遺伝子の発現制御を考慮した微生物の代謝ネットワークのモデル化とシステム解析

●清水 和幸

九州工業大学情報工学部生命情報工学科 / 慶應義塾大学先端生命科学研究所

＜研究の目的と進め方＞

我々は今まで、様々な微生物の代謝ネットワークシステムをin vivoあるいはオンラインで解析するための手法を開発し、バイオリアクターを利用して、工業的に有用な代謝産物あるいは遺伝子産物を効率的に生産するための研究を行ってきた。特に、細胞を生きたままで、丸ごと解析するために、生物の代謝システム解析とモデル化に関する研究を行ってきた。本プロジェクトでは、炭素同位体を利用した培養実験、およびNMRやGC-MSを利用して測定した細胞内同位体分布から、細胞内代謝流束分布を求め、これが、培養環境（溶存酸素濃度や炭素源）の変化や遺伝子の変異によって、どのように変化するかを求め、さらに、遺伝子発現、タンパク質発現、酵素活性、細胞内代謝物濃度と合わせて統合的に解析することによって、代謝調節制御機構を定量的に解析し、細胞の代謝システム全体のモデル化を行なおうとするものである。

＜研究開始時の研究計画＞

- (1) *Corynebacterium*を用いたアミノ酸(リシン)発酵について、先に開発した酵素反応モデルをもとに、代謝制御解析を行い、律速となる代謝経路を明らかにし、この経路の酵素活性を増幅させるため、遺伝子操作を行い培養実験を行ってリシンの生産を実際に向上できることを実験的に検証する。上記アミノ酸発酵システムについて、混合整数線形計画法を利用して、最適代謝制御構造の検討を行う。すなわち、代謝物と遺伝子との相互作用に関して、理論的検討を行う。
- (2) 物質収支のみを利用した通常の方法では、リサイクルを含んだり、分岐して合流する代謝経路については、流束分布を求めることができない。そこで本研究では、ラン藻*Synechocystis*の代謝経路解析に関して、同位体を用いた培養実験を行ない、¹H-¹³C NMRおよびGC-MSを用いた実験データの解析について検討し、原子写像行列を利用して細胞代謝流束分布が、培養環境（光強度、CO₂濃度、グルコース濃度）によってどのように変化するかを求め、エネルギー代謝についても検討する。
- (3) 同位体を利用した代謝流束分布解析について、統計解析を行ない、求めた流束の信頼限界を検討する。
- (4) 遺伝子組換え大腸菌によるPHB生産のための代謝ネットワーク解析を行なう。

＜研究期間の成果＞

- (1) *Corynebacterium glutamicum*によるアミノ酸(リジン)発酵について、細胞内の代謝物、NADPH、ATP濃度や酵素活性等を測定し、TCA回路のオキザロ酢酸からリジンまでの代謝反応をモデル化し、代謝制御解析(MCA)を行った。その結果、培養の中期で、aspartokinaseの活性が、また、後期では、permeaseの活性が律速になっていることがわかった。このことを検証するために、それぞれ、aspartokinaseと、比較

のためにdihydrodipicolinateの活性を高めた遺伝子組換え菌を作成し、前者の組換え菌では、確かにリジンの生産性が向上することを確かめた。

- (2) 基質であるグルコースの炭素原子の一部を¹³Cで標識し、シアノバクテリア細胞を用いたバイオリアクター実験を行なった。培養途中で採取した細胞内アミノ酸の同位体分布をNMRおよびGC-MSを利用して求め、細胞内代謝流束分布が、培養環境（光の照射やCO₂濃度）によって、どのように変化するかを求めた。その結果、単位グルコース消費当り（モルベースで）カルビン回路でのCO₂の固定は211.4%になることや、Ppc (PEPカルボキシラーゼ) によるCO₂の固定は73.4%であり、これは固定したCO₂の約25%であることなどがわかった。また、TCA回路から解糖系への糖新生経路の流束は84.6%になることもわかった。さらに、Pgi(フォスフォグルコースイソメラーゼ)、Rpi(リボース5-リン酸イソメラーゼ)などでの可逆度は大きく、PEP合成酵素は活性化されていないことがわかった。
- (3) 推定した細胞内同位体分布の信頼度を求めるために、統計解析を行ない、推定した代謝流束分布に対する90%信頼区間を求めた。すべての正味の代謝流束(net flux)は信頼区間が小さいが、可逆反応の流束については比較的大きいので、これらの結果の扱いには注意が必要であることがわかった。
- (4) phb遺伝子を組み込んだ温度誘導型組換え大腸菌について、プロテオーム解析を行ない、PHBの生成がタンパク質、特に、ヒートショックタンパク質に大きな影響があることを明らかにした。

＜国内外での成果の位置づけ＞

炭素同位体を利用した代謝流束分布解析自体は欧米のいくつかの研究機関でも行なわれており、それほど新しい手法ではないが、この方法で得られた代謝流束分布に加えて、遺伝子発現、タンパク質発現を調べ、これらの情報を統合的に解析することで、細胞の代謝調節制御機構を明らかにしようとするアプローチは世界的にも注目されている。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

遺伝子発現（トランスクリプトーム）、タンパク質発現（プロテオーム）、細胞内代謝物濃度（メタボローム）、代謝流束分布（フラクソーム）を網羅的に調べる、いわゆるオミックスに関するデータが、世界規模で蓄積されつつあるが、これらの情報を統合的に解析する手法をまだ確立できなかった。

＜今後の課題＞

遺伝子発現、タンパク質発現、酵素活性、細胞内代謝物濃度、代謝流束分布の情報を統合し、細胞の調節制御機構を明らかにするには、もっと多くの株について解析する必要があり、さらにこれらの数学的モデル化は今後

の大きな課題である。

細胞は、酵素レベル（代謝物による酵素のアロステリックな阻害など）、および遺伝子レベルで制御されており、今後は、これらの全体像を定量的に明らかにすることで、細胞全体（whole cell）の代謝調節制御機構を明らかにできれば、産業応用にも大きなインパクトを与えられると思われる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

Hua,Q., Chen,Y., Shimizu,K.: Design of metabolic regulatory structures for enhanced lysine synthesis flux using (log)linearized kinetic models, *Biochem.Eng.J.*, 7, 1-10 (2001)

M.Kabir, K.Shimizu, Proteome analysis of a temperature-inducible recombinant *E.coli* for PHB production, *J.Biosci.Bioeng.*,92,277-284(2001).

C.Yang, Q.Hua, K.Shimizu, Quantitative analysis of intracellular metabolic fluxes using GC-MS and 2-dimensional NMR spectroscopy, *J.Biosci.Bioeng.*, 93,78-87(2002).

C.Yang, Q.Hua, K.Shimizu, Metabolic flux analysis in *Synechocystis* using isotope distribution from ¹³C-labeled glucose, *Metabolic Engineering*, 4,202-214(2002).

C.Yang, Q.Hua, K.Shimizu, Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 813-822 (2002).