The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	出芽酵母を用いた物質生産のための代謝設計に関する研究
Author(s)	井田, 祥弘
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/24945
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

出芽酵母を用いた物質生産のための
代謝設計に関する研究

2013年1月

井 田　祥 弘

出芽酵母を用いた物質生産のための代謝設計に関する研究

２０１３年１月

井田祥弘

出芽酵母を用いた物質生産のための
代謝設計に関する研究

提出先　　大阪大学大学院情報科学研究科

提出年月　2013年1月

井 田　祥 弘

学位取得に関わる発表論文

1. 学術論文誌および掲載論文

[1] Ida, Y., Furusawa, C., Hirasawa, T., and Shimizu, H. (2012). Stable disruption of ethanol production by deletion of the genes encoding alcohol dehydrogenase isozymes in *Saccharomyces cerevisiae.* Journal of Bioscience and Bioengineering **113**, 192–195.

2. 国際会議

(査読有り)

[1] Ida, Y., Hirasawa, T., Furusawa, C., Shimizu, H. “Prediction and experimental evaluation of metabolic profiles using a genome-scale metabolic model of *Saccharomyces cerevisiae*” The 21st International Conference on Genome Informatics (GIW2010), Hangzhou, China, Dec. 16-18, 2010

[2] Ida, Y., Hirasawa, T., Furusawa, C., Shimizu, H. “A computer-aided design of lactate production process using *Saccharomyces cerevisiae*” The 22nd International Conference on Genome Informatics (GIW2011), Busan, Korea, Dec. 5-7, 2011

内容梗概

生物を用いた化学品生産は，非石油由来の基質を用いた生産の方法であること，不斉炭素を多く含む複雑な物質も生産できるなどのメリットがあり，今後発展が期待できる分野である．

物質生産を目的として微生物を利用する古典的な手法は，環境中に存在する微生物，あるいは遺伝子変異を引き起こす薬剤を利用し生じてきた細胞を，目的に応じてスクリーニングする方法である．このような有用微生物取得法により，抗生物質やアミノ酸の生産菌の取得が行われてきた．しかしながらスクリーニングによる育種の問題点として，細胞内で起きている代謝のメカニズムがブラックボックスのままとなってしまい，取得できた有用な性質をより向上させたり，他の細胞に付加するなどの応用はできなかった．次に，細胞内代謝反応に関する知見や遺伝子操作が利用可能になると，目的にあった遺伝子の破壊や過剰発現による，有用株の取得が広く試みられるようになった．しかしながら，どのような遺伝子操作を行うかの決定は各研究者の経験に依存し，細胞内の複雑なメカニズムを定量的に理解しつつ有効な育種を行えるとは限らなかった．このように現時点では微生物に有用物質生産能を付加するための確立された方法は存在しない．そこで本研究では，乳酸生産プロセスの構築を例とし，遺伝子操作株の作成から培養系の構築までを一貫して行い，そこから有用物質生産を目的とした育種に有用な知見を得ることをその目的とした．この目的に向け，本研究では代表的な工業微生物である出芽酵母を用いることとした．出芽酵母は増殖が比較的速く，安全性が広く認められているため，古くからモデル生物として研究対象とされ，遺伝子破壊や発現増強等の遺伝的手法が確立されている．また，全ゲノム情報の解読や，各種代謝反応の情報が整備されておりそれに基づく in silico 代謝モデルも構築されている．

本研究では乳酸生産プロセス開発のため大きく分けて 2 つの戦術を用いている．一つ目は分子生物学的育種による物質生産のための宿主細胞創成である．ここでは出芽酵母を用いた物質生産を行う際に重要な副産物となるエタノールおよびグリセロールの生産を，関連する遺伝子の多重破壊により安定的に抑制した宿主細胞を創製することに成功し，それを用いた乳酸生産株を構築した．二つ目は細胞内代謝を予測可能な in silico モデルの利用である．近年全ゲノムシーケンスに代表されるように，細胞内代謝反応に関する大量の知見が得られるようになった．このような大量の代謝反応に関する情報を網羅的に利用することで，細胞内で起きている代謝反応をシミュレートし，より効果的な育種が可能となると期待される．このような育種を実現する方法としてコンピューター上に構築した in silico モデルの利用が提案されている．すなわち大量の代謝情報を入力した in silico 代謝モデルを用いることで，細胞内で起きている代謝反応の網羅的な把握を可能とすることが試みられている．さらに in silico モデルを用いることで，どのような遺伝子の破壊または過剰発現，あ

るいは環境設定が目的物質の増産につながるかを予測できるようになり，ひいては細胞内代謝の精緻な設計が可能となると期待される．本研究ではコンピューター上に構築したゲノムスケール代謝モデルを用いることにより，微生物を用いた物質生産にむけた代謝設計法を開発することとした．

以下に本論文の内容を示す．

第 1 章では，従来の関連する研究について概観し，研究の背景および本論文の目的について述べる．

第 2 章では，出芽酵母を用いた物質生産の際，副産物となるエタノール，グリセロールの生産を恒常的かつほぼ完全に抑制した株の構築について述べる．本研究では出芽酵母の持つエタノール生産に関わるアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) 遺伝子 (*ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, SFA1*) とピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDC) 遺伝子 (*PDC1*) およびグリセロール生産に関わるグリセロール 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GPD) 遺伝子 (*GPD1, GPD2*) を複合的に破壊した株を構築し，得られた株がエタノールおよびグリセロールを生産しない性質を安定的に保持する性質を持つことを確認した．

第 3 章では，第 2 章で構築したエタノール-グリセロール生産抑制株を用いた乳酸生産プロセスの構築について述べる．本研究では in silico モデルを用いた代謝設計を可能とするため，細胞内の代謝フラックス分布を予測可能なゲノムスケール代謝モデルを用いた．具体的には，特定の 2 種類の代謝フラックスと生体構成成分バイオマス生産の関係性をみる PhPP (Phenotype phase plane) 解析を行い，第 2 章で構築したエタノールおよびグリセロールを生産しない株を用いて乳酸生産を行うためには，酸素供給のない状態を実現することが重要であることを示した．さらにその予測に基づいた乳酸生産を実際に行い，理論上最大の対糖収率である 2 (mol-lactate/mol-glucose) を示す乳酸生産を実現した．

第 4 章では，第 3 章で最適な乳酸生産条件を探索した PhPP 解析を乳酸以外の物質に拡張することを目的とした．第 3 章において乳酸生産の競合物質として見出されたアラニン，バリン，コハク酸，ソルビトールが生産される場合の代謝フラックス分布を解析した．また，エタノール-グリセロール生産抑制株に外来の遺伝子を導入することにより生産可能な 1,3-プロパンジオールについても述べた．

第 5 章では，本研究の結果をまとめ，本研究における代謝設計法の意義と応用可能性，そして今後の展望を述べた．

以上のように本論文では体系的な有用物質生産のための合理的な代謝設計法について提案しその有効性について述べた．

目次

第 1 章　序論 1
1.1　微生物を用いた有用物質生産 1
1.2　出芽酵母を用いた有用物質生産 2
1.3　酵母におけるエタノール・グリセロール生産経路の重要性 3
1.4　ゲノムスケール代謝モデルを用いた代謝設計 4
1.5　本論文の目的および構成 7
第 2 章　遺伝子破壊によるエタノール・グリセロール生産抑制酵母株の構築 9
2.1　緒言 9
2.2　実験材料および方法 11
2. 2. 1　使用菌株 11
2. 2. 2　使用培地 11
2. 2. 3　出芽酵母遺伝子操作株の構築 12
2. 2. 5　ジャーファーメンターによる培養実験 16
2. 2. 6　ADH 破壊株の連続培養 16
2. 2. 7　培養液中の菌体濃度の測定 16
2. 2. 8　培養上清中のグルコース・エタノール・グリセロール濃度の測定 17
2. 2. 9　Real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) 17
2. 3　結果 19
2. 3. 1　ジャーファーメンターを用いた野生株・*ADH1* 破壊株の回分培養 19
2. 3. 2　*ADH1* 破壊株の連続培養 20
2. 3. 3　酸素制限条件下での連続培養における ADH 遺伝子発現量の変化 21
2. 3. 4　ADH アイソザイム破壊株の長期培養によるエタノール生産抑制性安定化の検証 23
2. 3. 5　エタノール–グリセロール生産抑制株の構築 24
2.4　考察 27
2.5　結言 28
第 3 章　エタノール・グリセロール生産抑制酵母を宿主とした高収率乳酸生産のための代謝設計とその評価 29
3. 1　緒言 29
3. 2　実験材料および方法 31
3. 2. 1　使用菌株 31
3. 2. 2　使用培地 31
3. 2. 3　出芽酵母乳酸生産株の構築 31
3. 2. 4　坂口フラスコによる振とう培養 32

3. 2. 5　ジャーファーメンターによる嫌気培養 32
3. 2. 6　培養上清中のグルコース・エタノール・グリセロール濃度の測定 32
3. 2. 7　ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーション 33
3.3　結果 38
3. 3. 1　エタノール-グリセロール生産抑制株を用いた乳酸生産株 **S252** の構築 38
3. 3. 2　**S252** 株の坂口フラスコを用いた振とう培養実験 38
3. 3. 3　エタノール・グリセロール生産抑制株を用いた乳酸生産の収率向上へ向けた代謝設計 40
3. 3. 4　**S252** 株の嫌気条件における回分培養 46
3. 4　考察 50
3. 5　結言 51
第 **4** 章　ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションによるエタノール・グリセロール生産抑制株を用いた有用物質生産の実現可能性の解析 52
4. 1　緒言 52
4. 2　実験方法 54
4. 2. 1　**1,3-**プロパンジオール生産に必要な代謝経路の導入 54
4. 3　結果 55
4. 3. 1　**Group A** に属する物質の生産シミュレーション 55
4. 3. 2　**Group B** に属する物質の生産シミュレーション 68
4. 3. 3　エタノール・グリセロール生産抑制株による **1,3-**プロパンジオール生産のシミュレーション 72
4. 4　考察 75
4. 5　結言 77
第 **5** 章　結論 78
参考文献 83
謝辞 92
付録　本論文の関連文献と本章の対応 93

第 1 章　序論

1.1　微生物を用いた有用物質生産

近年，原油需要の増加により，化学製品を生産するための安定した石油代替原料の開発が望まれている．微生物を用いた物質生産は，植物や藻類が生産する光合成由来の炭水化物を利用することができるため，非化石資源による物質生産法の候補として期待されている．具体例としては，バイオエタノールやバイオディーゼルがアメリカやブラジルなどにおいてガソリンの代替として広く利用されている事例 (Lin and Tanaka, 2006; Antoni et al., 2007; Chisti, 2008)，またバイオプラスチックの原料として 1,3-プロパンジオールの微生物を用いた生産が特許化され，製品化されている事例 (Nakamura and Whited, 2003)，さらに従来は石油由来の原料より生産していた香料の一種である 2-フェニルエタノールを酵母を用いて生産する試み (Sendovski et al., 2010) などが挙げられる．このように微生物による物質生産は現在急速に利用例が増えているが，長期的な問題として原油資源の不足が危惧されていることから，その傾向は今後さらに加速されてくと予想される (Table 1.1).

生物を用いて燃料や化学品を生産するにあたり，微生物が本来生産しない，あるいは生産量の少ない有用物質を作らせる代謝改変，すなわち育種を行うための技術開発が望まれる．有用物質生産に用いられる微生物の取得における伝統的な方法は，土壌や海洋などの環境中から有用な微生物を取得する方法や，紫外線や変異誘導物質などにより突然変異を誘発し，目的とする表現型を示すものをスクリーニングする方法がある．これらの方法によりこれまでに抗生物質，アミノ酸，有機酸などの生産を行う微生物の取得が行われてきた (Demain, 2000). しかしながら, スクリーニングの実施は多大な時間と労力を要すること，また目的物質の生産メカニズムがブラックボックスのまま進行するため，得られた成果の他の物質生産法への応用が難しいことなど，複数のデメリットがある．また，スクリーニングにより得られた微生物が, そのまま十分な生産性を示すことはまれである. すなわち，それらの微生物の持つ触媒作用を実用的な産業プロセスに組み込むためには，生産性を改善する育種を行う必要がある．生産性に寄与する要素として，細胞自体を変化させることにより改善できる要素は大きく (1) 基質から目的物質への変換効率の改善，(2) 単位時間，あるいは単位細胞あたりの生産速度の改善，および (3) 生産性を低下させる各種ストレスに対する耐性の付与に分けられる．これらの改善は互いに競合するとは限らないが，それぞれが異なったアプローチを必要とする独立した課題である．本研究ではこれらのうち特に代謝経路を整備することにより基質から目的物質への生産効率を上げるための技術開発を行った.

目的物質の生産収率を改善する手法を模索することを目的とし，本研究では 2 つの育種のアプローチを試みた．一つ目は遺伝子の破壊や発現増強といった分子生物学的手法により直接代謝を変化させ，微生物が本来生産する物質を抑制し，目的物質の収率を上げるア

プローチである．もう一つは細胞内で起きている現象を定量的に把握するとともに，理想的には遺伝子破壊や過剰発現，環境設定により生物が起こす代謝反応の変化を予測，設計可能とすることで収率向上を試みるアプローチである．本研究ではこれら 2 つの方向から物質変換の収率を上げる方法について考察した．

Table 1.1　微生物を用いた物質生産研究の例

使用生物	目的生産物質	論文
Escherichia coli	エタノール	Torres et al., 2009
	コエンザイム Q10	Zahiri et al., 2006
	ラウリルラクトン	Yang et al., 2009
	L-バリン	Park et al., 2007
	L-スレオニン	Lee et al., 2007
	1,3-プロパンジオール	Nakamura and Whited, 2003
Saccharomyces cerevisiae	2-フェニルエタノール	Sendovski et al., 2010
	グリセロール	Cordier et al., 2007
	イソブタノール	Kondo et al., 2012
Corynebacterium glutamicum	リジン，グルタミン酸	Georgi et al., 2005
	D-乳酸	Okino et al., 2008
Pseudomonas Putida	ブタノール	Nielsen et al., 2009
Botryococcus braunii	バイオディーゼル	Banerjee et al., 2002

1.2　出芽酵母を用いた有用物質生産

本研究では微生物を用いた代謝設計法を開発するにあたり，宿主として出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を選択した．出芽酵母は古くからビールやワインなどのアルコール飲料の生産を行うために利用されてきた微生物である．さらに，近年では，バイオマスを原料としたエタノールの生産で大規模に利用され (Lin and Tanaka, 2006), また実験室レベルではグリセロール (Cordier et al., 2007)，1,3-プロパンジオール (Rao et al., 2008)，コハク酸 (Raab et al., 2010)，といった様々な化学品の生産に向けた研究が進められている．出芽酵母が広く用いられる理由としては，長年利用されてきた経緯から安全であると広く認められており，かつモデル生物としての研究より遺伝学や分子生物学，生化学に関する知見が蓄積されていること．また，遺伝子組換え実験技術が整備されており，全ゲノム DNA の塩基配列および細胞内の代謝が詳しく調べられ，データベースとしてまとめられていること (*Saccharomyces* Genome Database (Weng, 2003), Comprehensive Yeast Genome Data base (Mewes

et al., 2002), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Ogata et al., 1999)) などの技術的な優位性がある．また出芽酵母は高い酸耐性をもつことから，乳酸やコハク酸など酸性物質を生産するのに向いていることや，安価な合成培地で増殖可能であるため，育種の過程において煩雑な培地調整をすることなく均一な培養環境を迅速かつ容易に得ることができる (Dequin and Barre, 1994; Adachi, 1998; Ishida et al., 2005) こともメリットとして挙げられる．

1.3　酵母におけるエタノール・グリセロール生産経路の重要性

野生型の出芽酵母はその大きな特徴として，大量にエタノールおよびグリセロールを生産する性質をもつ．反面，これらの物質以外の生産を目的として出芽酵母を利用する場合には，これら 2 つの物質の生合成経路を破壊することが必要となる．そこで本研究ではこれらの経路に関わる遺伝子を破壊し，有用物質の生産に適した株の構築を試みた．

エタノールおよびグリセロールの生産は，酸化還元反応に関与する補酵素である還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の酸化を伴う反応である．還元型 NADH は特に解糖系のグリセルアルデヒド 3-リン酸を 1,3-ビスホスホグリセリン酸に変換する反応において，酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD^+) から生成される．解糖系は基質として取り込まれるグルコースのほとんどが流れ込む非常に大きなフラックスを持った反応であり，ここで生じる NADH を再び NAD^+に再酸化することは，生物にとって非常に重要な代謝上の制約となっている．出芽酵母は TCA サイクルを介し，電子伝達系で酸素を利用し NADH を酸化する経路も保持するが，酸素が過剰に存在する連続培養条件などを除き，通常出芽酵母において NADH 再酸化の大部分を行うのはエタノールやグリセロールの生産経路である．

野生型の出芽酵母において NADH の再酸化で主に働くのはエタノール生産経路である．嫌気条件において，この経路にはグルコースとして取り込まれた炭素の約 74%が流入することが Jouhten らによるフラックス解析の結果により示されている (Jouhten et al., 2008)．そのため，エタノール生産経路を抑制することは，取り込んだ炭素をより多く目的物質の生産経路に流すことに繋がる非常に重要なテーマとなっている．例えば，Cordier らはグリセロール生産のために，エタノール生産経路で主要な働きをしているとされるアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) をコードする *ADH1* の破壊株を (Cordier et al., 2007)，Ishida と Tokuhiro らは乳酸生産のために *ADH1* およびピルビン酸デヒドロゲナーゼ 1 (*PDC1*) の破壊を行い (Ishida et al., 2005, 2006a, 2006b; Tokuhiro et al., 2009)，いずれも目的物質収率の向上に成功している．

一方，野生型の出芽酵母においては，嫌気条件においてグリセロール生産経路に流れこむ炭素は取り込んだグルコースのおよそ 8.5%である．グリセロールは出芽酵母の野生型株がエタノールに次いで大量に生産する物質であり，その抑制も試みられている．例えば，

グリセロール生産経路について Guadalupe Medina らはグリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPD) をコードする *GPD1* と *GPD2* の二重破壊株を作成し，エタノール生産の収率向上を目的とした研究を行なっている (Guadalupe Medina et al., 2010)．さらに，エタノール生産経路の抑制を行うと，解糖系で生成された NADH を再酸化するために，グリセロール生産の増加が引き起こされることが Cordier らにより報告されている (Cordier et al., 2007)．これらのことから，エタノールとグリセロール以外の物質を出芽酵母に生産させる場合には，エタノール生産経路あるいはグリセロール生産経路いずれかを破壊するのではなく，これらを両方同時に破壊することが必要であることが推測される．

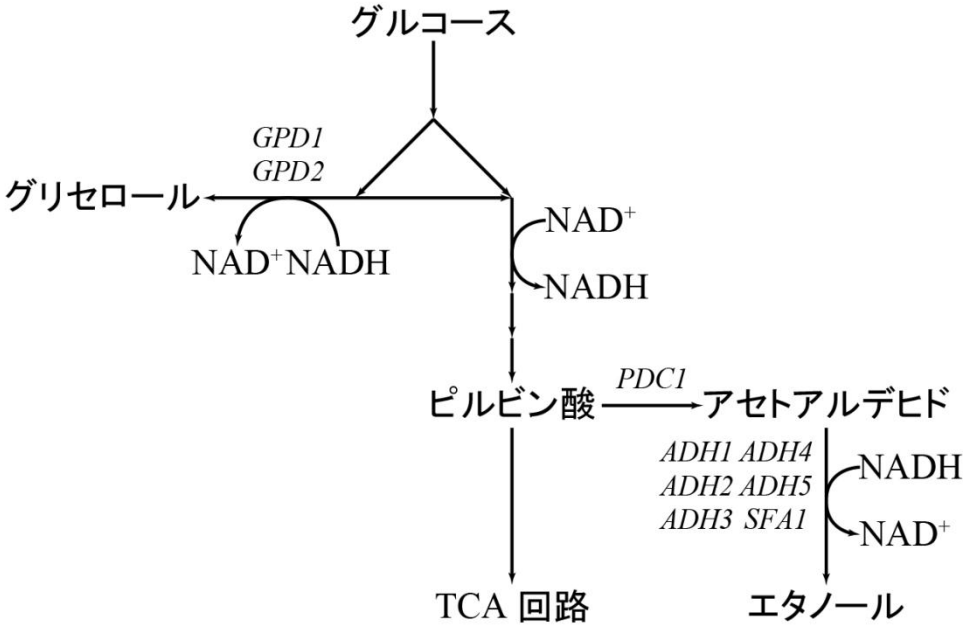

Fig. 1.1 発酵に利用される反応に着目して描いた出芽酵母の代謝経路．出芽酵母は取り込んだグルコースを解糖系を利用して分解する．この反応に伴い生産される NADH は酵母野生型株ではエタノールあるいはグリセロール生産経路にて消費される．本研究ではこれら 2 つの経路を図に示した遺伝子を破壊することにより同時に抑制した酵母株を構築した．

1.4　ゲノムスケール代謝モデルを用いた代謝設計

1.3 で議論したような細胞内代謝経路を遺伝子操作により変化させることは先行研究において多数試みられてきた．しかしながら，このような分子生物学的代謝改変は細胞内の代謝を厳密に決めることができないという意味で非定量的であり，その運用は各々の研究者の経験に依存する．それゆえ，構築した細胞が望みの性能を示さず，かつ細胞内における代謝反応が不明であるために現象の理解も困難である場合がある．これを解決する方法と

して本研究ではコンピューター上に構築した代謝モデルを利用した．

近年遺伝子解析技術の進歩により細胞が持つ全ゲノム情報を短時間で取得することが可能となった．次の段階として，そこで得られた遺伝子の情報を用いて実際の生物の振る舞いを表現可能なモデルを構築する事ができれば，細胞内で起きている遺伝子-代謝間のシステムを理解することにつながる．本研究で使用するゲノムスケール代謝モデルはこの目的のために 1999 年に Palsson らにより提案されたものである (Edwards and Palsson, 1999)．ゲノムスケール代謝モデルは，解読された全ゲノム情報を基に既知の代謝反応を網羅的に取り入れた数百から千種類の反応を持つ代謝ネットワークモデルであり，細胞内の代謝フラックスを計算することを可能とする．代謝フラックスとは，細胞内において，ある代謝物質が一定時間に変換される速度 (代謝物質の生産・消費速度) のことを指し，一般的には一定重量の菌体が一定時間に変換する物質量で与えられる．細胞内の代謝フラックスを決定することが出来れば，細胞内で起きている代謝反応の流れの大小を比較することが可能となる．このような情報から遺伝子操作のターゲットとなる代謝経路を探索することで，細胞内で起きている反応を理解しつつ育種を進めることができる．また，ゲノムスケール代謝モデルを用いた in silico シミュレーションを行うことで，実際に細胞株の構築や培養を行わずとも様々な条件下において実現しうる代謝フラックスを推定することが可能となる．すなわち in silico モデルを用いることにより生物の産業応用を行うにあたり必要な代謝設計が可能となると期待される．

ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションにおいては，代謝ネットワークの定常状態を仮定し，各反応のフラックスを推定する．定常状態とは細胞内に存在する各代謝物質の生成と消費の速度が等しく，蓄積および散逸がない状態のことである．定常状態におけるフラックスのバランスは化学量論式により数学的に表現する事ができ，これを実現可能な代謝状態を規定する第一の制約条件とする．また，細胞内の各代謝反応のフラックスが取りうる反応を規定しこれを第 2 の制約条件とする．ゲノムスケール代謝モデルではこれらの制約条件により規定される解空間の中で，特定の評価関数を，線形計画法を用いて最適化することで代謝状態を定める (Fig. 1.2)．ここで評価関数は目的に応じて定めることができる．評価関数として生体構成成分バイオマスの生産式を選択すると，生物が化学量論式およびフラックスの制約を満たした上で最も効率的にバイオマスを生産する代謝状態を定めることができる (Edwards et al., 2001; Ibarra et al., 2002)．また Z として目的物質の生産フラックスを選択すると，制約を満たした上で最も大きな目的物質生産フラックスを持った代謝状態を定めることが可能である．

ゲノムスケール代謝モデルは様々な生物で構築されているが，本研究では，上述したような好ましい性質を持つ出芽酵母を用いて研究を進めていくことと決め，酵母のゲノムスケール代謝モデルとして Duarte らによって構築された iND750 モデルを使用した (Duarte et al., 2004)．このモデルは 2004 年に公開されたモデルで，酵母の持つ 750 の遺伝子を考慮した 1149 の代謝反応，646 種類の代謝物質からなるモデルである．

ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションを基盤として，物質生産を行った例としては，Table 1.2 に示した研究が存在する．本研究では出芽酵母による乳酸生産をモデルケースとし，ゲノムスケール代謝モデルを用いて有用物質を生産するにあたり理想的な代謝状態の探索や，培養条件を変えた際に期待される代謝状態の予測を行い，高収率物質生産プロセスを実現した．さらに本研究で考案した手法の乳酸以外の有用物質生産への応用の可能性も検討した．

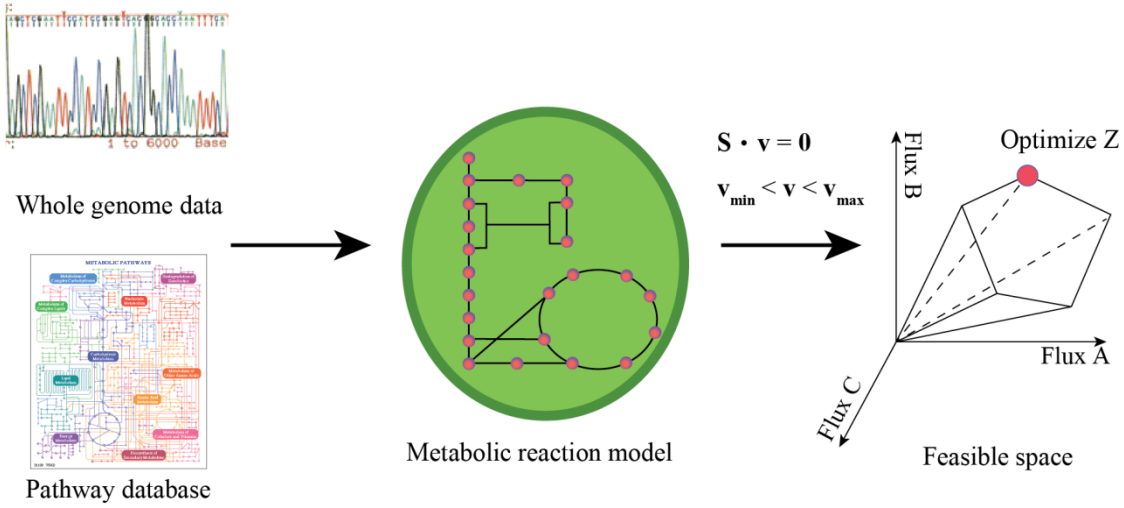

Fig. 1.2　ゲノムスケール代謝モデルによるシミュレーションの概略．ゲノムスケール代謝モデルはゲノム情報および酵素や代謝経路の知見より構築された細胞内代謝反応の大規模ネットワークモデルである．このモデルは，代謝経路の定常状態における制約を化学量論行列 **S** および代謝反応のフラックスベクトル **v** で規定する (**S・v = 0**)．また **v** のとりうる範囲を規定する．これらの制約式より各フラックスベクトルを次元とした空間の中でフラックスベクトルがとりうる範囲 (解空間) が規定される．しかしながら，これらの制約のみでは代謝状態の解が一意に定まることはない．そこでさらに特定の目的関数 Z を評価関数とし，この Z が最適化された代謝状態を求める．

Table 1.2　ゲノムスケール代謝モデルを用いた物質生産研究の例

使用生物 / 使用モデル	目的生産物質	論文
Escherichia coli		
EcoMBEL979	L-バリン	Park et al., 2011
Saccharomyces cerevisiae		
A model constructed by Förster et al., 2003	エタノール	Bro et al., 2006
iMM904	2,3-ブタンジオール	Ng et al., 2012
iFF708	クベボール	Asadollahi et al., 2009
Pseudomonas putida		
PpuMBEL1071	ポリヒドロキシアルカノエート (PHA)	Sohn et al., 2010
Mus musculus		
A model constructed by Sheikh et al., 2005	モノクローナル抗体	Selvarasu et al., 2009
Mannheimia succiniciproducens		
A model constructed by Hong et al., 2004	コハク酸	Lee et al., 2008

1.5　本論文の目的および構成

本研究は，微生物を用いた有用物質生産を可能とするための代謝設計法を開発することを目的とする．微生物を用いた物質生産法のラボスケールの開発においては細胞内で起きている代謝反応の把握および設計，設計した代謝状態を実現するための分子生物学的手法を用いた遺伝子操作，物質生産に最適な培養条件の検討が重要なプロセスとなる．本研究ではエタノールおよびグリセロールを生産しない出芽酵母の組換え株を用いた乳酸生産をモデルケースとして，これらのプロセスを一貫して行い，新規有用株の構築および代謝設計法の開発を行った．

本学位論文は第 1 章から第 5 章で構成される．

第 1 章「序論」では，本研究の背景として微生物を用いた物質生産の現状，使用している酵母および in silico 代謝モデルの紹介，そして本論文の目的と構成について記述した．

第 2 章「遺伝子破壊によるエタノール-グリセロール生産抑制酵母株の構築」では，出芽酵母のエタノール-グリセロール生産抑制株を構築し，得られた株の振る舞いを培養実験により検証した．特に出芽酵母の重要な形質であるエタノール生産に関連するアルコールデヒドロゲナーゼに着目し，これまで支配的な役割をしているとされていた *ADH1* の破壊のみではエタノール生産能を長期間安定的に抑制することはできないことを実験的に示した．そこで本研究ではさらに，安定なエタノール生産抑制能を付加するためにアルコールデヒドロゲナーゼのアイソザイムの多重破壊株を構築することに成功した．また，グリセロール生産にも着目して育種をおこない，エタノールおよびグリセロール生産が恒常的に抑制

された株の構築に成功した．

第 3 章「エタノール・グリセロール生産抑制酵母を宿主とした高収率乳酸生産のための代謝設計とその評価」では，第 2 章で構築したエタノール-グリセロール生産抑制株を高収率乳酸生産プロセスの構築に応用した．乳酸は近年プラスチックの原料として需要が拡大している物質で微生物を用いた生産の対象としても多くの研究が報告されている．先行研究との差異について，出芽酵母を用いて乳酸を生産する戦略としてエタノール生産の抑制は広く行われているが，その多くは *ADH1* の破壊に終始しており，ADH アイソザイム破壊株の利用およびグリセロール生産経路破壊との複合は行われていない．また，ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションに基づいて描いた Phenotype phase plane (PhPP) を利用した解析により，構築した乳酸生産株を用いることで収率のよい乳酸生産を達成する代謝状態およびそれを実現するための培養条件の推定を行い，実際に高収率の乳酸生産プロセスを構築することに成功した．

第 4 章「ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションによるエタノール・グリセロール生産抑制株を用いた有用物質生産の実現可能性の解析」では，第 3 章で利用した PhPP 解析を乳酸以外の有用物質に応用した結果について考察した．特に第 2 章で構築したエタノール-グリセロール生産抑制株を用いた生産が期待される有用物質の候補の提案，およびそれら生産プロセスの実現可能性について論じた．

第 5 章「結論」では，本研究で得られた結果をまとめ，微生物を用いた有用物質生産を可能とする代謝設計法について総括した．また，代謝設計に関する研究について今後の展望を述べた．

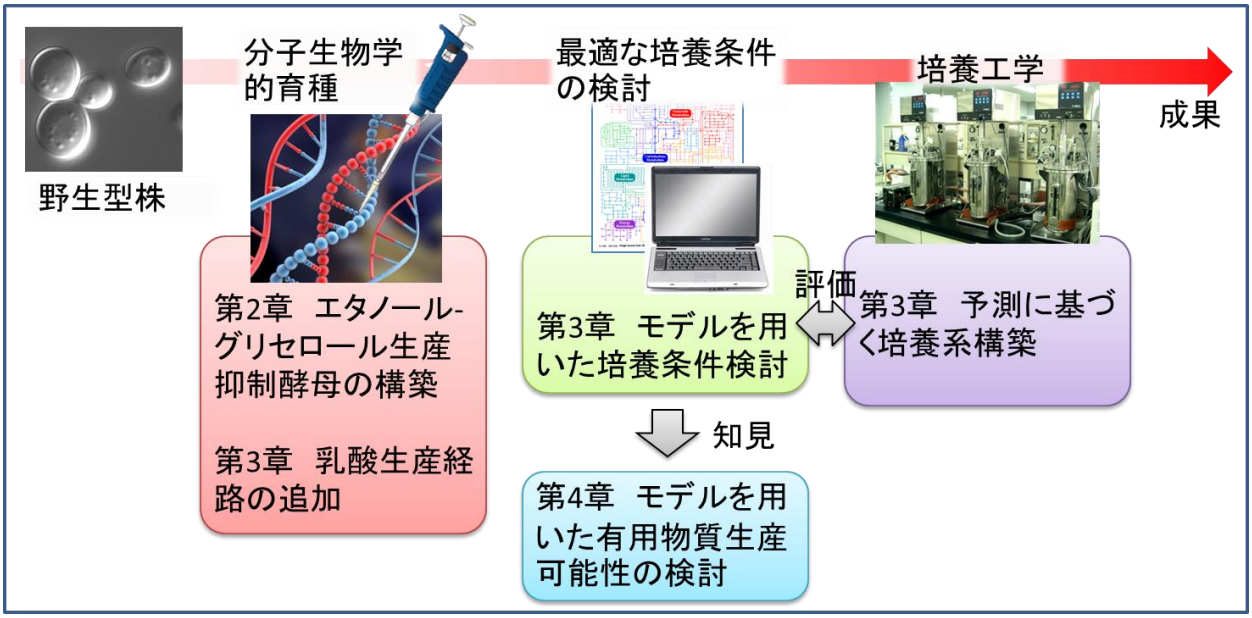

Fig. 1.3 本研究の概要

第 2 章　遺伝子破壊によるエタノール・グリセロール生産抑制酵母株の構築

2.1　緒言

出芽酵母の持つ特徴の一つにその高いエタノール生産能がある．この性質は古くから酒造の際に発揮されてきたものであり，近年ではバイオエタノールの生産にも利用されている (Kotaka et al., 2008; Matsushika et al., 2008). Jouhten らが行った出芽酵母のフラックス解析によると，野生型の出芽酵母においてエタノール生産経路に流れる反応の量は，嫌気条件では取り込んだ炭素の実に 74%に達する (Jouhten et al., 2008). このような基質として取り込む炭素の大部分をエタノールとして排出する性質は，酵母を用いてエタノール以外の有用物質を生産する際に大きな障害となるものである．それゆえ，エタノール生産の抑制は，出芽酵母を用いて様々な物質生産を試みる際に重要となりうる．

本研究では，出芽酵母のエタノール生産能を抑制するため，アルコールデヒドロゲナーゼ (alcohol dehydrogenase; ADH) に着目した. ADH はエタノール発酵経路の最終段階の反応，すなわちアセトアルデヒドを NADH を用いてエタノールに還元する反応を触媒する酵素である．酵母のエタノール生産経路に関する他の遺伝子として，ピルビン酸デカルボキシラーゼ (pyruvate dehydrogenase; PDC) という酵素も存在している．本研究では，エタノール生産の抑制を試みるにあたり，PDC ではなく ADH の破壊を重視した．それは，PDC 経路の完全な破壊はアセトアルデヒドの生成を完全に抑制してしまい，サイトゾルにおけるアセチル CoA，さらには脂肪酸の合成が困難となり，グルコースを単一炭素源としては生育できなくなるという結果が先行研究において示されているためである (Flikweert et al., 1999; van Maris et al., 2004a). 本研究でもエタノール生産経路の抑制のため PDC の破壊は検討したが 3 つ存在するアイソザイムのうち *PDC1* の破壊にとどめた．一方，ADH について，出芽酵母は多くの ADH アイソザイムを保持している．これまでの先行研究ではその中で特に *ADH1* がエタノール発酵において主要なアイソザイムであるとされてきた．それゆえ，現時点で多数存在するエタノール生産の抑制を物質生産に利用しようという研究においては，*ADH1* のみの破壊に終始している (Cordier et al., 2007; Tokuhiro et al., 2009). これらの研究では，確かに *ADH1* の破壊によりエタノール生産の抑制が見られることが報告されている．一方で，*ADH1* のみの破壊ではそのアイソザイム遺伝子の増幅がおこることにより，アイソザイムの発現が増加し，*ADH1* 破壊の影響を緩和するという報告もなされている (Dorsey et al., 1992; Paquin et al., 1992). このことより本研究では *ADH1* のみの破壊は恒久的なエタノール生産抑制のためには不十分であると考えた．そこで本研究では *ADH1* に加えそのアイソザイムである *ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, SFA1* の破壊を行った株を構築し，その性質を調べた．

また，前出の Jouhten らによるフラックス解析によると，出芽酵母は嫌気条件において取

り込んだ炭素の 8.5%程度をグリセロールとして排出する．この量はエタノールと比較すると少量であるが，グリセロール生産量は ADH を破壊すると，エタノール生産経路が果たしていた NADH 再酸化の役割を補填するために増加することが知られている (Cordier et al., 2007)．したがって，グリセロール生産の抑制も出芽酵母を用いた物質生産を試みる際に重要となる．先行研究においてグリセロール生産の抑制は，グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (glycerol-3-phophate dehydrogenase; GPD) をコードする *GPD1* および *GPD2* の破壊により完全に抑制可能であることが知られている (Guadalupe Medina et al., 2010)．本研究では構築したエタノール生産抑制株に対して，さらに *GPD1* と *GPD2* 遺伝子の破壊も行うことにより，グリセロール生産の抑制も行った． 本章で構築したエタノール-グリセロール生産抑制株は第 3 章以降において実際に有用物質生産プロセスを試みる際に有用な素材となると期待される．

2.2　実験材料および方法

2. 2. 1　使用菌株

本章で用いた酵母菌株と大腸菌株を Table 2.1 に示す.

Table 2.1　第 2 章で用いた酵母菌株および大腸菌株

Strain	Genotype
Saccharomyces cerevisiae	
BY4739 (Brachmann et al., 1998)	*MAT α leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*
S043	*adh1 Δ0*
S177	*adh1 Δ0 adh2 Δ0 adh3 Δ0 adh4 Δ0 adh5 Δ0 sfa1::URA3*
S245	*adh1 Δ0 adh2 Δ0 adh3 Δ0 adh4 Δ0 adh5 Δ0 sfa1 Δ0 pdc1 Δ0 gpd1 Δ0 gpd2 Δ0*
Escherichia coli	
DH5α	F^- *Φ80dlacZ ΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*

2. 2. 2　使用培地

酵母の培養には，Synthetic defined (SD) 培地 (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.2 or 2% glucose) を用いた．また，酵母の栄養要求性に応じてアミノ酸 (0.0076% leucine, 0.038% lysine hydrochloride, 0.0076% uracil) を添加した．また遺伝子破壊操作のために YPD 培地 (1% bacto yeast extract, 2% bacto peptone, 2% glucose)，2xYPAD 培地 (2% bacto yeast extract, 4% bacto peptone, 4% glucose, 0.2% adenine) を用いた．各々の培地で寒天培地を作成する際は終濃度 2% (w/v) となるように agar を添加した.

大腸菌の培養には，L 培地 (1% bacto polypeptone, 0.5% bacto yeast extract, 0.5% NaCl, 0.1% glucose) を用いた. プラスミドを保持した大腸菌の培養には L 培地にアンピシリン (終濃度 50 μg/ml) を添加した．寒天培地を作成する際は終濃度 1.5% (w/v)となるように agar を添加した.

2. 2. 3　出芽酵母遺伝子操作株の構築

2. 2. 3. 1　酢酸リチウム法による形質転換

酵母の形質転換は酢酸リチウム法を用いて行った (Gietz and Woods, 2002). YPD あるいは SD 寒天培地で生育させた酵母菌株の単一コロニーを 5 ml の YPD 液体培地に植菌し，30 °C で 24 時間振盪培養した．その培養液 1 ml を 50 ml の 2xYPAD 培地を入れた 500 ml 容坂口フラスコに接種し，30 °C，120 rpm で振盪培養した．増殖した菌体を遠心 (5000 rpm，4 °C，5 min) により回収し，得られた菌体を滅菌水に懸濁して 50 µl ずつエッペンドルフチューブに分注した．次に遠心分離 (13000 rpm，4 °C，1 min) により菌体を沈殿させ，上清を完全に取り除いた後，プラスミドあるいは PCR 断片の溶液 34 µl を加えた．このエッペンドルフチューブに 240 µl の 50% (w/v) polyethylene glycol 3350，36 µl の 1.0 M 酢酸リチウム溶液，50 µl の 2 mg/ml boiled salmon sperm-carrier DNA を加え，激しく攪拌して菌体を懸濁した．得られた懸濁液を 42 °C で 1 ~ 2 時間インキュベートした後遠心 (13000 rpm, 4 °C, 1 min) して上清を捨て，100 µl の滅菌水に懸濁した．選択培地に懸濁液を塗布した後 3 ~ 7 日間 30 °C で静置培養し，目的とする形質転換体のコロニーを得た．本研究で遺伝子破壊に用いたプライマーを Table 2.2 に示す．遺伝子の破壊の確認は，破壊する遺伝子の上下流 50bp 程度に存在する領域と相補するプライマー (Table 2.3) を設計し，PCR により増幅されるバンドをアガロースゲル電気泳動により確認した．また，遺伝子の多重破壊を行うために各破壊株は 1 つあるいは 2 つのマーカー遺伝子で破壊するごとに次に記す Cre-loxP システムを用いてマーカーの除去を行い，順次多重破壊株を構築した．

2. 2. 3. 2　Cre リコンビナーゼシステムによる遺伝子マーカーの除去

今回行った遺伝子破壊操作では，マーカー部位の除去を行うため，遺伝子破壊用マーカー断片の両端にあらかじめ loxP と呼ばれる配列が付くようにプライマーが設計してある (Gueldener et al. 2002)．したがって，マーカーは loxP 配列に挟まれた状態で染色体に導入されている．マーカー除去操作は次の手順で行った．

遺伝子破壊後の株にプラスミド pSH47AUR を酢酸リチウム法で導入した．このプラスミドは Cre recombinase をコードする遺伝子を *GAL1* promoter の下流に保持しており，またオウレオバシジン耐性遺伝子を保持している．pSH47AUR を導入した株を YPD 培地で増殖させ，100 µl の菌体溶液を YPGal 培地 (1% bacto yeast extract, 2% bacto peptone, 2% galactose) に植継ぎ 2 時間培養した．このとき，Cre recombinase が発現し，染色体上の loxP 部位同士で組換えが起き，マーカー遺伝子が除去される．ガラクトース培地で数時間増殖させた菌体溶液を YPD プレートに塗布した．生じたコロニーについて，PCR でマーカーが除去されているかを確認した．次に pSH47AUR を除去するため，マーカーの除去が確認されたコロニーを YPD 液体培地で一晩培養した後 YPD プレートに植菌し，コロニーを得た．得られ

たシングルコロニーをオウレオバシジン (終濃度 250 ng/ml) を入れたものと，入れていないYPDプレート培地にレプリカし，オウレオバシジンに耐性を持たない株を取得することにより pSH47AUR の除かれた遺伝子破壊株を得た.

Table 2.2　遺伝子破壊株の構築に用いたプライマー

Primer Number	Sequence	目的
1	ATATTTCAAGCTATACCAAGCATACAATCAACTATCTCATATACAAGCTGAAGCTTCGTACGC	*ADH1* 破壊
2	TATAACTTATTTAATAATAAAAATCATAAATCATAAGAAATTCGCCATAGGCCACTAGTGGATCTG	*ADH1* 破壊
3	AAGCATACAATCAACTATCAACTATTAACTATATCGTAATACACAAGCTGAAGCTTCGTA	*ADH2* 破壊
4	ACTTGATAATGAAAACTATAAATCGTAAAGACATAAGAGATCCGCCATAGGCCACTAGTG	*ADH2* 破壊
5	TCACAGTTAAAACTAGGAATAGTATAGTCATAAGTTAACACCATCAGCTGAAGCTTCGTA	*ADH3* 破壊
6	TATAAACAAAGACTTTCATAAAAAGTTTGGGTGCGTAACACGCTACATAGGCCACTAGTG	*ADH3* 破壊
7	TAGTTTTTAGTTCGCGCATCACGAGGTACGTGTTTAATATGTCAGAGCTGAAGCTTCGTA	*ADH4* 破壊
8	ATAAGGCACACGCATAATTGACGTTTATGAGTTCGTTCGATTTTTCATAGGCCACTAGTG	*ADH4* 破壊
9	ACCTAAGAAAATTATTTAACTACATATCTACAAAATCAAAGCATCAGCTGAAGCTTCGTA	*ADH5* 破壊
10	TTATATAAAAAGTAAAAATATATTCATCAAATTCGTTACAAAAGACATAGGCCACTAGTG	*ADH5* 破壊
11	TACAAAATCTCCAAGTAAAGAAGGAATATAAGTAATATAAGTACAAGCTGAAGCTTCGTA	*SFA1* 破壊
12	TTCCAGAAAATTTGAGTCATGCTTACTTAGTTTAATTAAGTACTCCATAGGCCACTAGTG	*SFA1* 破壊
13	TCTACTCATAACCTCACGCAAAATAACACAGTCAAATCAATCAAAAGCTGAAGCTTCGTACGC	*PDC1* 破壊
14	AAAAATGCTTATAAAACTTTAACTAATAATTAGAGATTAAATCGCCATAGGCCACTAGTGGATCTG	*PDC1* 破壊
15	CCACAAACACAAATATTGATAATATAAAGATGTCTGCTGCTGCTGAGCTGAAGCTTCGTA	*GPD1* 破壊
16	GATATGTTATCTTTCTCCAATAAATCTAATCTTCATGTAGATCTACATAGGCCACTAGTG	*GPD1* 破壊
17	CAATTCTCTTTCCCTTTCCTTTTCCTTCGCTCCCCTTCCTTATCAAGCTGAAGCTTCGTA	*GPD2* 破壊
18	GATAAATTGGTTGGGGGAAAAAGAGGCAACAGGAAAGATCAGAGGCATAGGCCACTAGTG	*GPD2* 破壊

Table 2.3 遺伝子破壊の検証に用いたプライマー

Primer Number.	Sequence	目的
19	CGCACACTACTCTCTAATGAG	*ADH1*破壊の検証
20	TAGAGCCCAACTGAAGGCTA	*ADH1*破壊の検証
21	GGTAAAGCTATAGCATGCCTATCAC	*ADH2*破壊の検証
22	GTCTACAGTTTAGAGGAATGGGTAC	*ADH2*破壊の検証
23	GGAGTCAAAGGCTTTTCGCC	*ADH3*破壊の検証
24	GACGGAAGCCAAATTTGGGC	*ADH3*破壊の検証
25	CCCCGGAGGCCTTCAATGAGCTTCC	*ADH4*破壊の検証
26	CGTTCTTCTTTTTTCAATTTAAAAC	*ADH4*破壊の検証
27	GACGCGGGATCGTTCCTTCG	*ADH5*破壊の検証
28	GTCCACCGGTTCTCGCAAAG	*ADH5*破壊の検証
29	ACCTCTGTAAGTTACGTAATAATGG	*SFA1*破壊の検証
30	ATTGCTGAAGAACGTAATTGTGCGC	*SFA1*破壊の検証
31	TCAGCTTATGGTGATGGCAC	*PDC1*破壊の検証
32	CCATGGTAAGTGACAGTGCAGTA	*PDC1*破壊の検証
33	CAAGAAACAATTGTATATTGTACAC	*GPD1*破壊の検証
34	TATGAATATGATATAGAAGAGCCTC	*GPD1*破壊の検証
35	TAATTTTTAAGTTTATGTATTTTGG	*GPD2*破壊の検証
36	ATGTTACTAGTAGTAGTTGTAGAAC	*GPD2*破壊の検証

2. 2. 5　ジャーファーメンターによる培養実験

BY4739 (野生型株), S043 (*ADH1* 破壊株) の培養は 1 L ジャーファーメンター (Able-Biott, Tokyo, Japan) を用いて行った．前培養，本培養とも培地には SD 培地 (2% glucose) を用いた．培養中の攪拌速度は 300 rpm，通気は 0.2 L/minAir，温度は 30 °C に制御した．pH は 2 M の NaOH 水溶液を用いて 6.0 に調整し培養を行った.

2. 2. 6　ADH 破壊株の連続培養

エタノール生産抑制能の安定性を見るための ADH 破壊株の連続培養には，250 ml 容のジャーファーメンター (Able-Biott, Tokyo, Japan) を用いた．–80°C で保存した菌株のストック 250 µl を 5 ml の SD 試験管培地に植菌し，24 時間培養した．その培養液 5 ml を 100 ml の SD 培地を入れたジャーファーメンターに接種し, 100 rpm で撹拌しながら温度 30 °C で通気をせずに培養した．菌体が十分に増殖した後，希釈率が 0.1 h^{-1} の連続培養に切り替えた．また，pH は 2 M NaOH 水溶液を用いて 6.0 に調整した.

2. 2. 7　培養液中の菌体濃度の測定

菌体収率 (g-biomass/g-glucose) を求めるためには培養液中の菌体濃度を求めることが必要となる．本研究では，菌体の乾燥重量を用いて培養液中の菌体濃度を表すこととした．培養液の菌体濃度は分光光度計を用いて測定した OD660 に比例すると考えられるので，OD660 から菌体濃度を求める換算式を導出することとした.

YPD 寒天培地に生育させたコロニーを 5 ml 試験管 YPD 培地に植菌し，24 時間振とう培養を行った．その培養液を 1 ml ずつ 3 本の 100 ml 坂口フラスコに接種し，30 °C, 120 rpm で振盪培養した．そして，培養開始 2 時間目から 2 時間ごとに 12 時間目までの培養液をフィルトレーションし，フィルター上の菌体を乾燥させその重量を測定した．その結果得られた培養液の OD660 と 1L 当たりの乾燥菌体の重量の関係をグラフにしたものを Fig. 2.1 に示す.

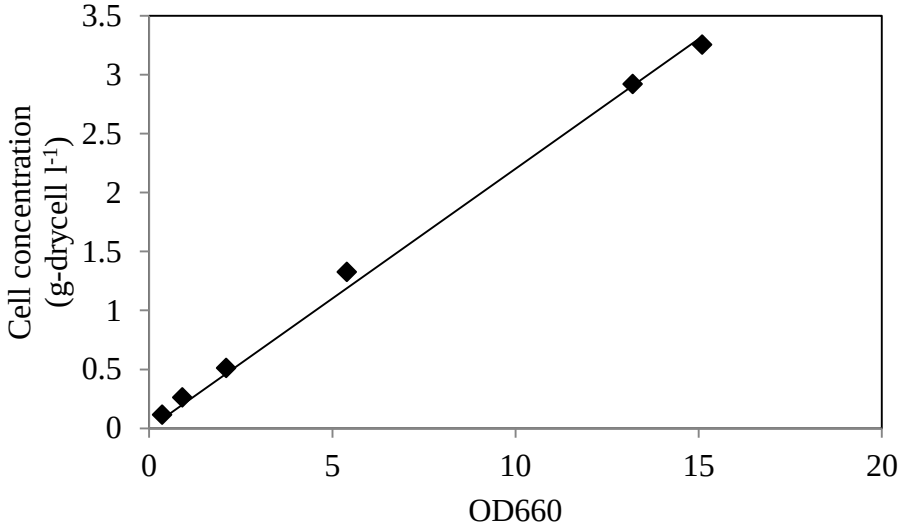

Fig. 2.1　BY4739 株の乾燥菌体重量と OD660 の関係のプロット

この結果より，OD660 と乾燥菌体重量の間には

(乾燥菌体重量：g dry cell l^{-1}) = 0.22 (g dry cell l^{-1} $OD660^{-1}$) × (OD660)

が成り立つので, 本研究ではこの換算式を利用して OD660 の測定値から菌体濃度を求めた.

2. 2. 8　培養上清中のグルコース・エタノール・グリセロール濃度の測定

サンプルの分析については，取得したサンプルから遠心により菌体を取り除いた上清を用いた. グルコース濃度は, 酵素電極法バイオセンサ (BF-5i; Oji Scientific Instruments, Hyogo, Japan) を用いて測定した.

エタノールの測定は FID (Flame Ionization Detector, 水素炎イオン化型検出器) 検出器を備えたガスクロマトグラフ (7890A; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) を用いた．カラムは Stabiliwax column (0.32-mm internal diameter, 60-m length and 1-µm thickness; Restek Co., Bellefonte, PA) を用いた．濃度定量のため，サンプルには 3-メチル 1 ブタノールを内部標準として混合し，測定した．グリセロールの測定は F-kit (F-kit Glycerol; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用い，マニュアルに従って行った.

2. 2. 9　Real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR)

RNA 抽出の培養は ADH 破壊株の連続培養終了時にストックしておいた培養液をジャーファーメンターに植菌し，ADH 破壊株の連続培養と同様の条件で培養した．培養はまず 48 時間回分培養を行った後，希釈率 0.1 h^{-1} の連続培養に切り替え，さらに 48 時間培養した時点で菌体を回収し，RNA の抽出を行った．発現量解析用の total RNA の抽出には

Ribopure-yeast kit (Ambion, Austin, TX, USA) を用い，抽出操作はマニュアルに従った．

遺伝子発現量を調べるためのリアルタイム RT-PCR を行うにあたり，total RNA を鋳型とし，PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio) を用いて逆転写反応により cDNA を生成した．リアルタイム RT-PCR は，得られた cDNA をテンプレートとし，Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) と遺伝子ごとに設計したリアルタイム PCR 用プライマー (Table 2.4) を用いて行った. PCR には Applied Biosystems StepOnePlus™ Real Time PCR System を用いた.

Table 2.4　リアルタイム PCR による発現量解析に用いたプライマー

Primer No.	Sequence	Gene
39	GGTACTGTTGTCTTGGTTGGTTTG	*ADH2*
40	AGCCGACAATGGAGATAGACTTG	*ADH2*
41	CTGACATTCAAGAAGCTACCAAAGG	*ADH3*
42	GGCAAACCAACCAAAACGA	*ADH3*
43	ATTGGTGGTGGTTCTGCTCAC	*ADH4*
44	ACACCTTCATAGTCTCCGATTTCC	*ADH4*
45	CGTTGAAAAGAGCCAATGTGA	*ADH5*
46	GGATTGCCAGAGAACCCAAG	*ADH5*
47	ACTTTTCCCTTGCGTTCTGG	*SFA1*
48	ACTTACATTTGCCACACTCAGCA	*SFA1*
49	CTCCACCACTGCTGAAAGAGAA	*ACT1*
50	CCAAGGCGACGTAACATAGTTTT	*ACT1*

2. 3　結果

2. 3. 1　ジャーファーメンターを用いた野生株・*ADH1* 破壊株の回分培養

出芽酵母は多数のアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) 活性を持つ遺伝子を保持しており，その中で *ADH1* は主要な働きをしているとされている (de Smidt et al., 2008, 2012)．本研究ではこの *ADH1* を破壊した酵母株を構築し，その性質を培養を行うことにより確認した．

Fig. 2.2 は 1 L ジャーファーメンターで行った酵母野生型株 (BY4739) と *ADH1* 破壊株 (S043) を培養した際の菌体濃度 (OD660)，グルコース濃度，エタノール濃度，グリセロール濃度の経時変化を示す．また，この培養結果より計算した比増殖速度および各代謝物質の対糖収率を Table2.5 に示す．この結果より野生型株と *ADH1* 破壊株 (S043) とでは，比増殖速度に明確な違いがあることが明らかとなった．*ADH1* 破壊株の比増殖速度は 0.180 h^{-1} であり，野生型株のおよそ半分となった．また，出芽酵母の野生型株ではエタノールが主生産物であるのに対し，*ADH1* 遺伝子を破壊した S043 ではエタノールの生産量が大幅に低下し，かわりにグリセロールの生産量が増加するということが確かめられた．この結果は先行研究における *ADH1* 破壊株の挙動と一致する (Cordier et al., 2007; de Smidt et al., 2012).

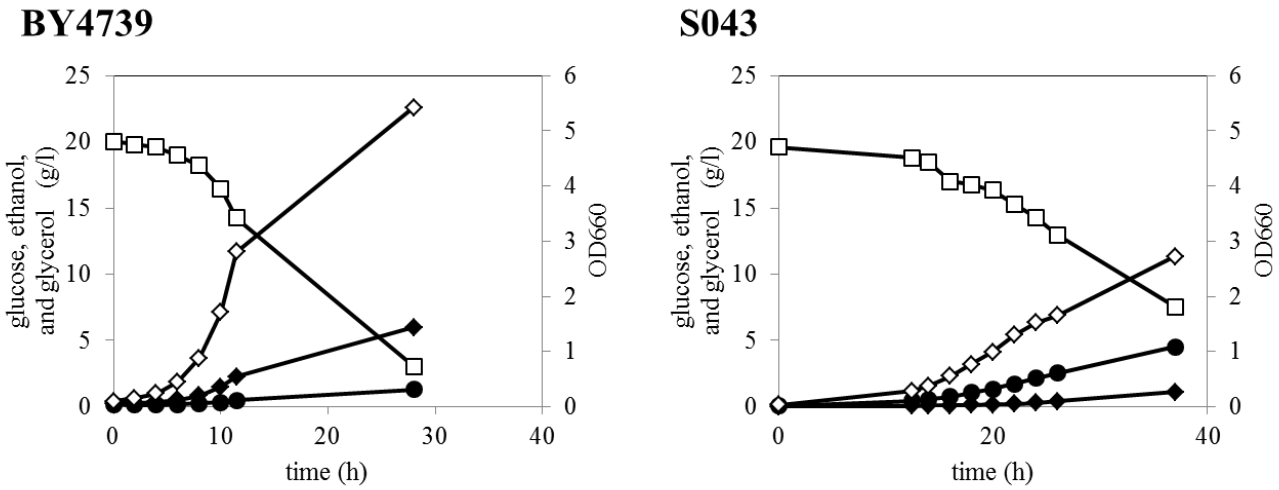

Fig. 2.2 1 L ジャーファーメンターを用いた回分培養における BY4739 および S043 の各代謝物質の経時変化　シンボルはそれぞれ OD660 (◇)，グルコース (□)，エタノール (◆)，グリセロール (●)の培養上清中の濃度を示している．

Table 2.5 1 L ジャー培養終了時における各株の比増殖速度および培養終了時の生産物収率

	Strains	
	BY4739	S043
比増殖速度(h^{-1}) [a]	0.332	0.180
Biomass (g/g-glucose consumed) [b]	0.069	0.049
Ethanol (g/g-glucose consumed) [b]	0.340	0.088
Glycerol (g/g-glucose consumed) [b]	0.067	0.386

[a] 対数増殖期における比増殖速度．各数値は，BY4739 のものは 4 ~ 10 h，S043 のものは 12.5 ~ 18 h における培養液中の菌体濃度 OD660 から求めた．

[b] エタノールおよびグリセロールの収率は，培養終了時点で生成消費された各代謝物質濃度から求めた．

2. 3. 2　*ADH1* 破壊株の連続培養

ジャーファーメンターを用いた回分培養より，*ADH1* の破壊により出芽酵母のエタノール生産が抑制されることが確認された．しかしながら，エタノール生産は完全には抑制されていなかった．また，先行研究においても *ADH1* 破壊株が依然著量のエタノールを生産する例が報告されている (Cordier et al., 2007)．また，*ADH1* 破壊株が遺伝子増幅 (gene amplification) とよばれる，ADH のアイソザイムである *ADH2* や *ADH4* 遺伝子のコピー数を増やす変異により *ADH1* 破壊の効果を打ち消すという実験結果も報告されている (Dorsey et al., 1992; Paquin et al., 1992)．そこで，構築した *ADH1* 破壊株 (S043) の保持する，エタノールを生産しないという表現型の安定性を，酸素制限条件下での長期間の連続培養により検証した．なお，連続培養実験は独立して 2 度行った．

その結果を Fig. 2.3 示す．Fig. 2.3C, D に示されるようにエタノールの生産収率は，2 回の独立の培養実験で共に増加した．このエタノール生産収率の上昇は，*ADH1* を破壊しても，ADH 活性が数十世代経ることで徐々に回復したことを示している．また，今回行った 2 回の培養では，異なったエタノール生産の回復挙動を示すように見える．すなわち Fig. 2.3A に示した培養ではエタノール収率が 0.15 (g/g-glucose) 程度までしか増加せず，グリセロール収率の明確な低下も見られなかったのに対して，Fig. 2.3B に示した培養では 0.3 (g/g-glucose) 程度まで増加し，同時にグリセロール収率の低下も確認された．この挙動の違いは，これら 2 つの培養実験において，異なるメカニズムによって ADH 活性が回復したことを示唆する．

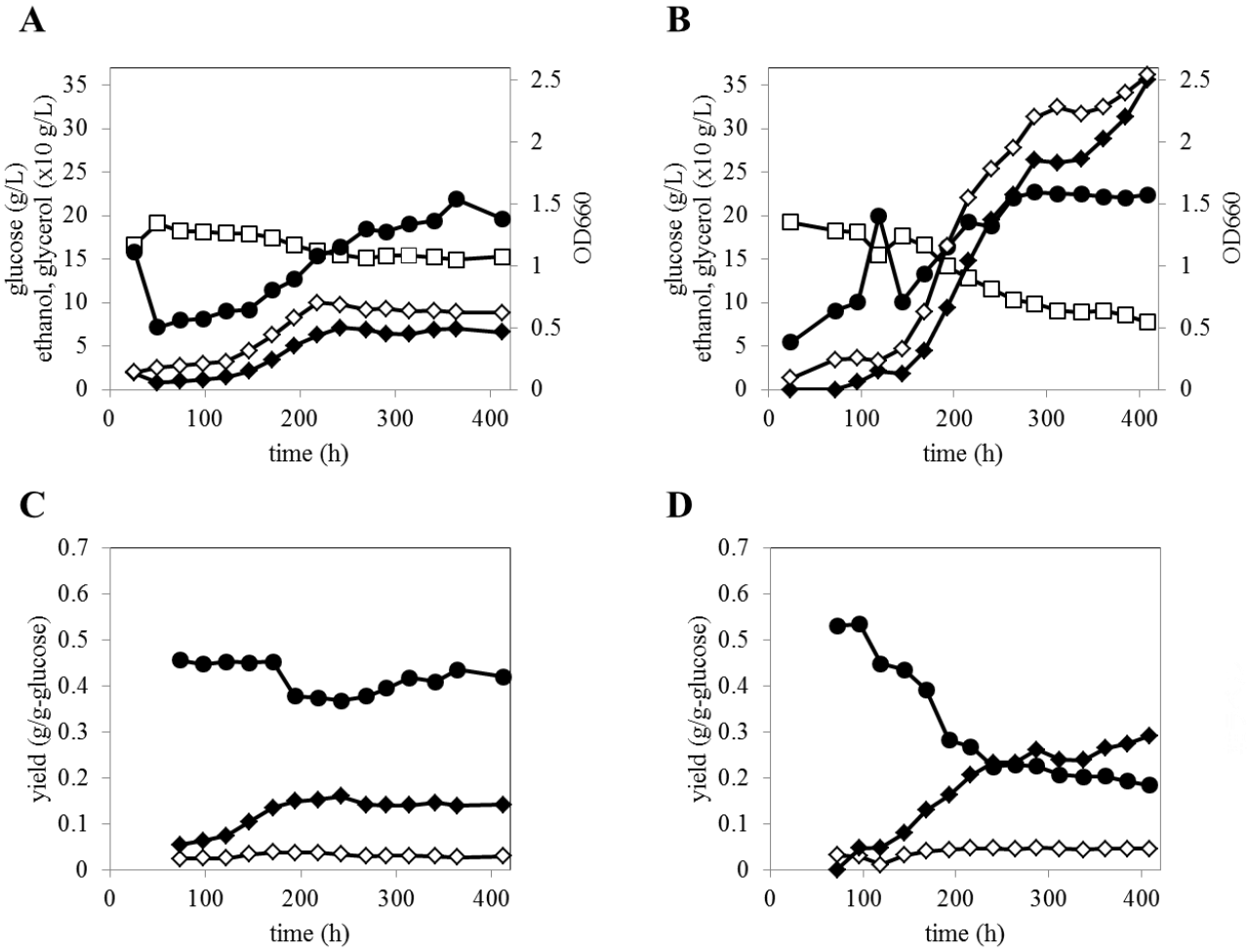

Fig. 2.3 酸素を制限した条件下における *ADH1* 破壊株の連続培養．(A, B) は同条件かつ独立した 2 回の連続培養において測定された培養結果で，シンボルはそれぞれ OD660 (◇)，グルコース (□)，エタノール (◆)，グリセロール (●) の培養上清中の濃度を示している．横軸の時間は連続培養が開始されてからの時間を示している．(C, D) は，A，B それぞれの培養実験でのバイオマス (◇), エタノール (◆), グリセロール (●) の収率を示している．

2. 3. 3　酸素制限条件下での連続培養における ADH 遺伝子発現量の変化

ADH1 遺伝子の破壊により構築された S043 株のエタノール生産能は，野生型株と比較して明らかに減少した．しかしながら長期間の培養によりエタノール生産が回復することが結果 2. 3. 2 で示した連続培養実験により確認された．その原因として酵母のエタノール生産に関連する ADH のアイソザイムの発現量変化が考えられたため，リアルタイム RT-PCR により遺伝子発現量の変化を解析した．この解析を行うため，Fig. 2.3 で示した連続培養実験の終了時点での培養液を凍結保存しておいたものを，再びジャーファーメンターに植菌し，同様の連続培養を行った．その結果，Fig. 2.3A, B で見られたような定常状態における

菌体濃度の高低 (Fig. 2.4)，エタノール生産性の違いがそのまま維持された (RNA 抽出用サンプル中のエタノール収率 (g/g-glucose) A : 0.21, B : 0.27)．そこで連続培養開始から 48 時間後に培養液から細胞を取得し，トータル RNA を調製し，リアルタイム RT-PCR 解析に供した (Fig. 2.5)．その結果，Fig. 2.3A に対応する菌体においては ADH アイソザイムをコードする遺伝子のうち，*ADH2* の発現量が大きく増加していることが確認された．一方，Fig. 2.3B に対応する菌体においては，*ADH2* と *ADH4* の発現量増加が確認された．よって，*ADH1* 破壊株の連続培養においてエタノール生産能の回復が見られたのは，ADH アイソザイムをコードする遺伝子の発現量が培養の過程において上昇したことが原因であり，また，Fig. 2.3A と Fig. 2.3B の 2 回の培養実験において，エタノール生産の回復のメカニズムが異なることも確認された．

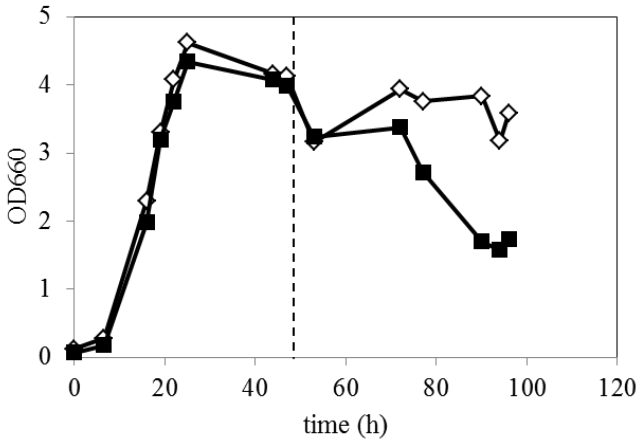

Fig. 2.4 RNA 抽出用サンプル培養時の菌体濃度変化．破線は連続培養開始時を示す．また，各シンボルは (■) が Fig. 2.3A の培養実験由来，(◇) が Fig. 2.3B 培養実験由来の凍結サンプルからの菌体の培養挙動を示す．

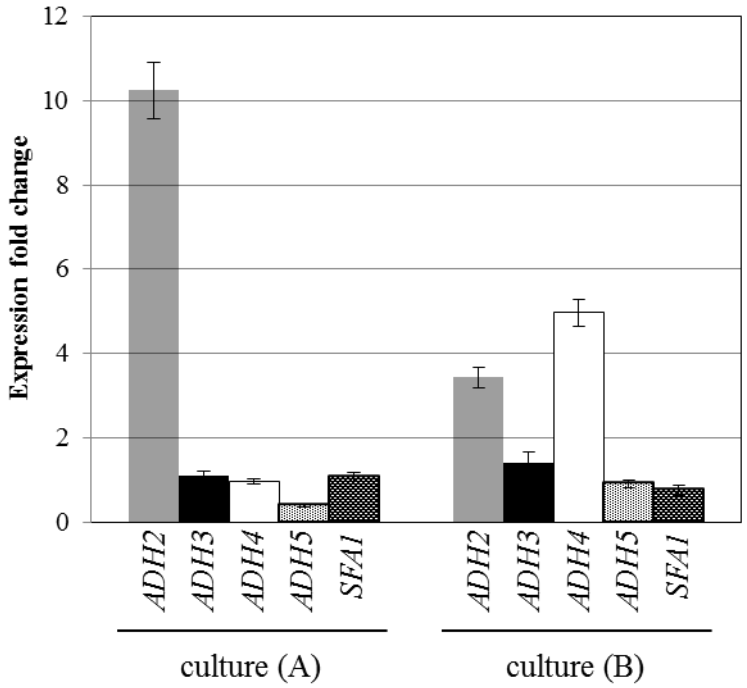

Fig. 2.5 リアルタイム PCR による連続培養後の S043 における ADH アイソザイム遺伝子の発現量の比較．A, B はそれぞれ Fig. 2.3 の (A，B) の培養実験により得られた菌体を表す．発現量は, 連続培養を行う前の S043 株における各遺伝子の発現量に対する比で表している．エラーバーは 3 つの独立したリアルタイム PCR 実験の標準偏差を表す.

2. 3. 4　ADH アイソザイム破壊株の長期培養によるエタノール生産抑制性安定化の検証

ADH1 破壊株 (S043) では長期間の培養を行うことで ADH のアイソザイムの発現量が変化し，エタノール生産能が回復することが遺伝子発現量解析により確かめられた．そこで本研究では *ADH1* 破壊株に対してさらに NADH 依存性アルコールデヒドロゲナーゼである *ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, SFA1* の破壊を行った. 構築した S149 (ADH アイソザイム破壊株) 株について，S043 (*ADH1* 破壊株) と同様の酸素制限下での連続培養を行ったところ，この株では長期に渡る培養を経てもエタノール生産が回復しないことが確認された (Fig. 2.6).

この結果より構築した S149 (ADH アイソザイム破壊株) 株は，エタノール生産抑制能を長期に渡り安定に保持することが確認できた.

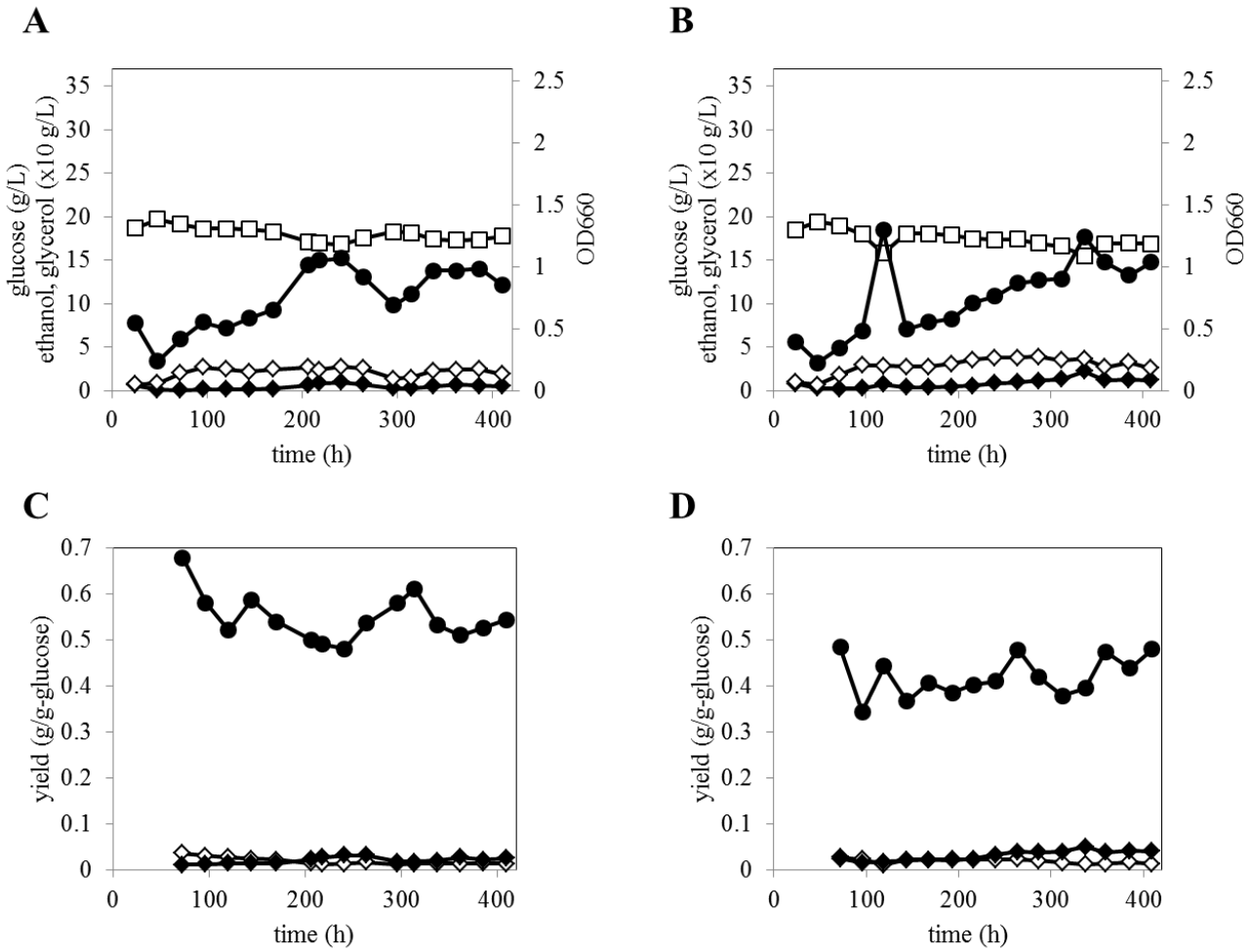

Fig. 2.6 酸素を制限した条件下における *ADH1-5*・*SFA1* 破壊株 S149 の連続培養．(A, B) は同条件かつ独立した 2 回の連続培養において測定された培養結果で，シンボルはそれぞれ OD660 (◇)，グルコース (□)，エタノール (◆)，グリセロール (●)の培養上清中の濃度を示している．横軸の時間は連続培養が開始されてからの時間を示している．(C, D) は，A, B それぞれの培養実験でのバイオマス (◇)，エタノール (◆)，グリセロール (●)の収率を示す．

2. 3. 5　エタノール-グリセロール生産抑制株の構築

上述の ADH 遺伝子破壊株を培養した結果から，エタノール生産経路の破壊によりグリセロールの生産量が増加することが確認された．出芽酵母を用いた物質生産を行うにあたり，新たに生産されるようになった多量のグリセロールは，エタノール同様目的物質生産にあたり副産物である．そこで本研究では，構築したエタノール生産抑制株に対し，さらにピルビン酸デヒドロゲナーゼ *PDC1* 遺伝子を破壊することにより完全にエタノール生産経路を破壊するとともに，グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *GPD1*, *GPD2*

の破壊を行い，グリセロール生産の抑制を試みた．Fig. 2.7 は，坂口フラスコを用いて行った野生型株とエタノール-グリセロール生産経路破壊株 (S245) の培養結果を示している．この培養実験結果から，エタノール-グリセロール生産経路破壊株は BY4739 と比較してエタノール生産量が 1/10 程度となった．

この培養では，野生型株と比較するとごく少量であるものの検出可能な量のエタノールの生産が見られた．出芽酵母のエタノール生産のメカニズムとしては本研究で破壊した *ADH1* ~ *ADH5* および *SFA1* の他に *ADH6* (González et al., 2000; Larroy et al., 2002a) および *ADH7* (Larroy et al., 2002b) が存在することが報告されている．これらのアイソザイムは近年報告された NADPH 依存性アルコールデヒドロゲナーゼである．本研究では既知の NADH 依存性アルコールデヒドロゲナーゼは全て破壊したので，ここで見られたエタノール生産はこれら NADPH 依存性アルコールデヒドロゲナーゼによるものである可能性が考えられる．

一方グリセロールの生産は完全に抑制されることが実験結果より示された．

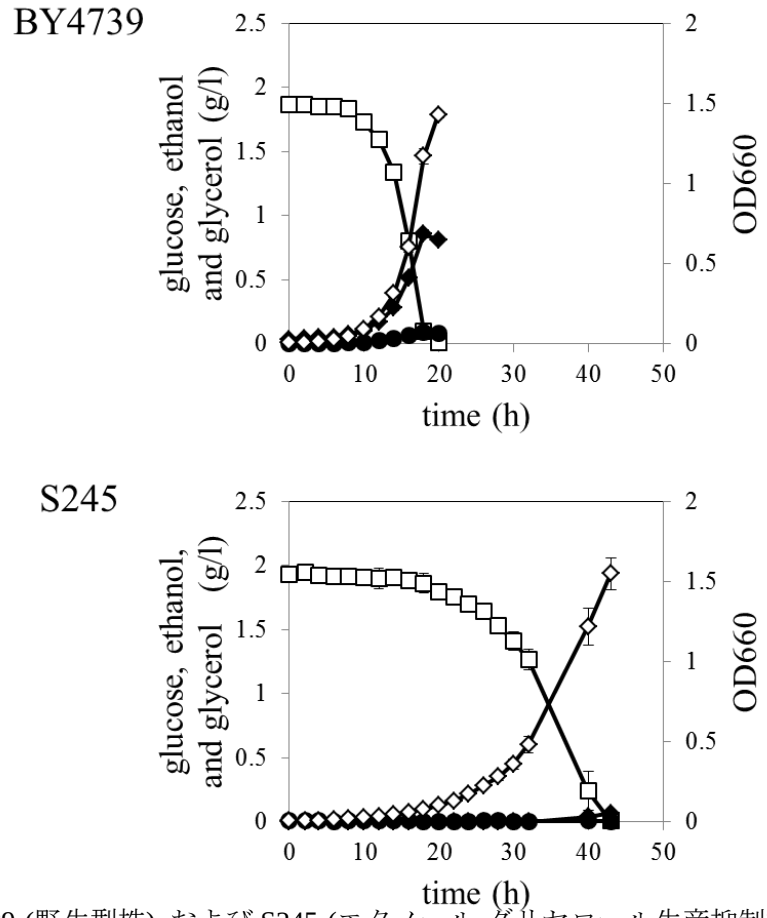

Fig. 2.7 BY4739 (野生型株) および S245 (エタノール-グリセロール生産抑制株) を坂口フラスコで培養した結果．OD660 (◇) およびグルコース (□)，エタノール (◆)，グリセロール (●) の濃度の経時変化を示している． 3 回の培養結果の平均値±標準偏差を示している．

Table 2.7　坂口フラスコにおける各株の比増殖速度および培養終了時の生産物収率

	Strains	
	BY4739	S245
比増殖速度 (h^{-1}) [a]	0.299±0.007	0.135±0.000
Ethanol (g/g-glucose consumed)[b]	0.416±0.013	0.035±0.004
Glycerol (g/g-glucose consumed)[b]	0.045±0.0	未検出

各値は 3 つの独立した坂口フラスコにから求めた平均値および標準偏差.

[a] 対数増殖期における比増殖速度. 各数値は, BY4739 のものは 2 ~ 16 h, S245 のものは 6 ~ 32 h における培養液中の菌体濃度 OD660 から求めた.

[b] エタノール, グリセロール収率はグルコース枯渇時に生成された各代謝物質濃度から求めた.

2.4 考察

本章では，出芽酵母のエタノールおよびグリセロール生産経路の両方を破壊した株を構築可能であることを示した．出芽酵母においてこれら 2 つの経路は，どちらも NADH 再酸化という役割を果たしているが，それぞれの経路の破壊が代謝に与える影響は異なる．出芽酵母のエタノール生産は，解糖系で生じた NADH の再酸化において最も大きな役割を果たしている．解糖系は生命維持および増殖に必須な ATP を作ることができる反応で，その効率こそ酸素を利用してミトコンドリア内で行われる反応に劣るものの，野生型の酵母においてはかなりの ATP が解糖系で生産される．解糖系の反応は NADH の生成を伴うため，持続的な代謝反応を維持するためにはこの NADH を再酸化するメカニズムが必要となる．出芽酵母は通常，エタノール生産経路を利用してこの NADH の再酸化を行なっている．このような役割を持つことから，エタノール生産経路は出芽酵母の排出する物質の中で最も大きな割合を占めており，出芽酵母を用いた物質生産において目的物質の収率向上の大きな障害となる場合がある．本研究では出芽酵母のエタノール生産を抑制するためにエタノールデヒドロゲナーゼ (ADH) をコードする遺伝子に着目した．

出芽酵母は複数の ADH アイソザイムを保有していることが知られている(de Smidt et al. 2008). その中で主要な働きをしているとされ, 多くの先行研究 (Cordier et al., 2007; Tokuhiro et al., 2009) でエタノール生産抑制のためのターゲットとなっている *ADH1* の破壊株を構築したところ，エタノール生産の減少が確認され，それとともに比増殖速度の低下が見られた．ADH を破壊することによる比増殖速度の低下は先行研究でも報告されているが，その原因は明らかになっていない．一説には，ADH の破壊により細胞に対して毒性を示すアセトアルデヒドが蓄積することが細胞の比増殖速度低下の原因であると推測されている (Skory, 2003).

次に，*ADH1* 遺伝子の破壊のみではエタノール生成を抑制するには不十分であり，*ADH1* 破壊株を酸素制限下で培養すると，ADH のアイソザイムをコードする遺伝子の発現量が増加し，エタノール生産が回復することを確認した．前述の de Smidt らの総説などに示されるように，出芽酵母が保有する ADH アイソザイムは，それぞれ異なる特性を有していることが知られている．出芽酵母は本研究で破壊した NADH 依存性のアルコールデヒドロゲナーゼである *ADH1* ~ *ADH5, SFA1* と NADPH 依存性アルコールデヒドロゲナーゼである *ADH6, ADH7* を持っている．これらのうち今回発現量の増加がみられた *ADH2* と *ADH4* について，これらの遺伝子の発現量増加によるエタノール生産量の増加はこれまで報告されていない．しかしながら Paquin らの報告により，*ADH1* の破壊により電子伝達系を阻害するアンチマイシン A に対する耐性を失った酵母は，染色体上の *ADH2* および *ADH4* のコピー数を増加させることによりアンチマイシン A に対する耐性を獲得することが報告されている (Paquin et al., 1992). 本研究で見られた *ADH2* および *ADH4* の発現量変化もこのような遺伝子のコピー数の増加が原因である可能性がある．

さらに本研究では NADH 依存性の ADH アイソザイムをすべて破壊した株を構築し，これらアイソザイムを破壊することが，酵母がエタノールを生産しないという表現型を恒常的に保持するために必要であることを明らかにした．しかしながら，この破壊株は，酸素供給を制限した連続培養においてエタノールの代わりにグリセロール生産が増加していることが明らかとなった．

野生型酵母におけるグリセロール生産の役割は，「レドックスシンク」と呼ばれている．野生型の出芽酵母においては解糖系を流れるフラックスの量が，エタノール生産経路に流れるフラックスよりも多くなる．これは解糖系を流れた炭素の一部がアミノ酸や脂肪酸などの生体構成成分に変換される経路に流入するためであり，これによりエタノール生産経路のみで再酸化される NADH は解糖系で生成される NADH よりも少なくなる．この過剰の NADH を再酸化するため酵母は，解糖系の上流でグリセロール合成に炭素を流し， NADH の酸化還元バランスをとる．野生型の出芽酵母はエタノールおよびグリセロールを生産するが，本研究によりその両経路を破壊した株を構築することも可能であることが示された．作成された S245 株は, 好気条件下では解糖系で生産される NADH の全てがミトコンドリアの電子伝達系で再酸化されると推測される．さらにこの株は外部から NADH 依存性の反応系を組み込むことで, その経路を利用した NADH の再酸化を開始する可能性も考えられる．

以上のように，今回構築した株は出芽酵母が通常の状態で生産するエタノールおよびグリセロールの両経路を失っており，NADH 依存性の反応を強くドライブする性質を示す可能性を持つことから，今後，エタノールおよびグリセロール以外の物質生産合成経路を付与することで目的の物質を生産する組換え酵母を作ることができると期待される．

2.5 結言

本章では出芽酵母のエタノールおよびグリセロール生産経路に着目し，それらを遺伝子破壊により抑制した株を構築し，その挙動を培養実験により検証したことについて述べた．エタノール生産経路において主要な働きをしている ADH の破壊に関しては，従来主要な働きをしているとされていた *ADH1* のみの破壊では安定してエタノール生産抑制能を保持することは不可能であり，エタノール生産能が回復しうることを酸素制限下での連続培養実験により明らかにした. 一方, ADH のアイソザイムをすべて破壊した株を構築することで，エタノールを生産しないという表現型を安定的に示す株を得た．また，本研究では構築した ADH アイソザイム破壊株に対してさらに，エタノール生合成にかかわる酵素をコードする *PDC1* とグリセロール生産に関わる酵素をコードする *GPD1*, *GPD2* を破壊した株も構築した．これにより得られた S245 株 (*adh1*Δ*0 adh2*Δ*0 adh3*Δ*0 adh4*Δ*0 adh5*Δ*0 sfa1*Δ*0 pdc1*Δ*0 gpd1*Δ*0 gpd2*Δ*0*) は，エタノールおよびグリセロールの生産能を失っていることが確認された．第 3 章では，構築した S245 株をベースとした実際の物質生産プロセス構築を論じる．

第 3 章　エタノール・グリセロール生産抑制酵母を宿主とした高収率乳酸生産のための代謝設計とその評価

3. 1　緒言

第 2 章では野生型の出芽酵母が主生産物とするエタノールおよびグリセロールの生産経路を破壊した株の構築について述べた．第 3 章では，第 2 章で作成したエタノール-グリセロール生産抑制株を用いて高収率で目的物質を生産させるための代謝状態の設計とそれを実現するための培養条件の決定，およびその実験による評価について述べる．

本研究では，物質生産のターゲットとして乳酸を選択した．乳酸は食品，化粧品，医薬品，そして化学産業で広く用いられる物質である．また近年は，バイオプラスチックとして知られるポリ乳酸の原料としても注目されている (Okano et al., 2009, 2010)．特に微生物を用いて生産した乳酸は，その原料に化石資源を利用しないため，地球温暖化の原因とされている CO_2 の総量を増加させにくいカーボンニュートラルな性質も注目されている．先行研究における微生物を用いた乳酸生産では，多くの場合乳酸菌が利用されてきた (John et al., 2007)．それらの結果における乳酸生産収率は取り込まれた 1 mol のグルコース (6 炭素) が 2 mol の乳酸 (3 炭素) に変換される場合に達成される理論最大収率である 2 に対して 1.8 (mol/mol-glucose) を超えるものも報告されている．しかしながら，*Lactobacillus* 属などの乳酸菌は，L-乳酸の生産にかかわる L-乳酸脱水素酵素と D-乳酸の生産にかかわる D-乳酸脱水素酵素の両方持っているため，生産される乳酸の光学純度が 100%を下回る場合が多い．そのため近年では，出芽酵母を用いた乳酸生産が注目されている．野生型の出芽酵母は乳酸をほとんど生産しないため，外来の L-乳酸脱水素酵素あるいは D-乳酸脱水素酵素を細胞内で発現させることで，導入した酵素に依存した乳酸の光学異性体を生産することができ，その光学純度はほぼ 100%を達成させることができる (van Maris et al., 2004b; Ishida et al., 2006a, 2006b)．また，出芽酵母は低 pH ストレスに強いという性質ももっており，生産された乳酸により培養液の pH が低下しても高い生産性を維持することができると期待される．

生物を利用した物質生産プロセスを実現するためには，細胞内で起きている代謝反応を把握した上で，目的物質生産を行う上で好ましい代謝状態を適切に設計することが必要とされる．そして，得られた株を最適な培養条件で培養することで設計された代謝状態を達成させ，実際に高い収率を実現する，というプロセスを経ることが望まれる．本研究では，乳酸をターゲット物質として，その生産収率を高めるために必要な代謝状態の設計，およびそれを実現するための培養条件を決定することで，高収率の乳酸生産プロセスの構築を目指した．高い乳酸収率を達成させる代謝状態を設計するために本研究では，ゲノムスケール代謝モデルによる in silico シミュレーションを行った. ゲノムスケール代謝モデルとは，ゲノム情報を基に，数百から千種類程度の代謝反応を組み込んだ代謝反応モデルである．このモデルは，化学量論行列による可能な代謝反応の規定と，線形計画法によるバイオマ

ス生産などの目的関数の最適化により，定常状態における代謝の流れ (フラックス) を計算することを可能とする．すなわち，ゲノムスケール代謝モデルを用いることにより，様々な条件における細胞内で起きている代謝反応のフラックスを，定量的に推定することができる．また，遺伝子破壊による代謝状態の変化を推定することができるので，ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションは，微生物を用いた有用物質生産においてその生産収率を向上させるための遺伝子改変戦略を導き出すためにも有用であると期待される．しかしながら，ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションの結果を実際の細胞の代謝改変に対してどのように活かすことが可能であるかという方法論は確立されていない．

これを検証するため，本研究では第 2 章で構築したエタノール-グリセロール生産抑制株にヒト由来の乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase A : LDHA) を高発現させるプラスミドを導入することにより，乳酸生産株を構築した．乳酸生産の反応は NADH の酸化を伴うので，細胞内の主要な NADH 再酸化メカニズムが失われたエタノール-グリセロール生産抑制株を用いることにより，高収率の生産が可能であることが期待される．このエタノール-グリセロール生産抑制株による L-乳酸生産について，その収率をより高くするための代謝状態を，ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションを援用することにより設計し，それを実現させるための培養条件を予測した．その結果，予測に基づき構築した培養条件において LDHA を導入したエタノール-グリセロール生産抑制株を実際に培養し，取り込んだ炭素源のほぼ 100%を乳酸に変換する培養プロセスの構築に成功した．

3. 2　実験材料および方法

3. 2. 1　使用菌株

本章で用いた酵母菌株と大腸菌株を Table 3.1 に示す.

Table 3.1　第 3 章で用いた酵母菌株およびプラスミド

	Genotype	Reference
Strains		
BY4739	*MATα leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*	Brachmann et al., 1998
S245	*adh1 Δ0 adh2 Δ0 adh3 Δ0 adh4 Δ0 adh5 Δ0 sfa1 Δ0 pdc1 Δ0 gpd1 Δ0 gpd2 Δ0*	This work
S252	S245 carrying pNV11-LDHA	This work
Plasmid		
pNV11	YEp24-based plasmid, *URA3*, *TDH3* promoter and terminator, ori for *E. coli*, *bla*	Shibuya et al., 1992
pNV11-LDHA	pNV11 carrying human LDH cDNA	This work

3. 2. 2　使用培地

酵母の培養には，Synthetic defined (SD) 培地 (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.2% or 2% glucose) を用いた．また，酵母の栄養要求性に応じてアミノ酸 (0.0076% leucine, 0.038% lysine hydrochloride, 0.0076% uracil) を添加した.

3. 2. 3　出芽酵母乳酸生産株の構築

プラスミドに挿入する LDHA 断片を得るため，東洋紡より購入した LDHA を含む cDNA を鋳型とし，Table 3.2 に示すプライマーを用いて PCR 増幅した．PCR 産物を Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega) を用いて精製した後，酵母の発現ベクターである pNV11 の *Eco*RI-*Xho*I サイトに挿入した. その後, 構築したプラスミドを酢酸リチウム法により S245 株に導入した.

Table 3.2　遺伝子発現増強株用プラスミドの構築に用いたプライマー

Primer Name	Sequence
LDHA-Fwd-EcoRI	TCCGAATTCAATATGGCAACTCTAA
LDHA-Rev-XhoI	ATGCTCGAGGAAGACTTTAAAATTG

3. 2. 4　坂口フラスコによる振とう培養

グリセロールスタートストック 250 µl を 5 ml の SD (2% glucose) 試験管培地に植菌し, 分光光度計を用いて測定した OD660 がおよそ 1 になるまで培養した．つぎに 100 ml の SD (0.2% glucose) 培地を入れた坂口フラスコに初発 OD660 値が 0.01 となるように培養液を植菌し培養した．なお，坂口フラスコを用いた培養における初発のグルコース濃度は 0.2 %としたが，これは本研究で用いる株のグルコース消費速度は遅いため，グルコース濃度の変化量を読み取りやすくするためである．

3. 2. 5　ジャーファーメンターによる嫌気培養

グリセロールストック 250 µl を 5 ml の SD (2% glucose) 試験管培地に植菌し，OD660 が約 1 になるまで培養した．つぎに前培養液を，100 ml の SD (2% glucose) 培地を入れた坂口フラスコに OD660 が 0.01 となるように培養液を植菌し，72 時間培養した．培養液をファルコンチューブに移して遠心 (5000 rpm，5 min，室温) した．遠心後上清を捨て，菌体をファルコンチューブ一本あたり 20 ml の滅菌水に懸濁した後もう一度同条件で遠心し，上清を捨てた．すべての菌体を 5 ml の滅菌水に懸濁した後，OD660 が約 4 となるように 100 ml の SD (0.2% glucose) 培地を入れたジャーファーメンターに植菌した．培養は撹拌回転数 100 rpm，温度 30 °C，pH 制御なしで行った．なお，ジャーファーメンターを用いた培養における初発のグルコース濃度は坂口フラスコによる培養と同様 0.2 %としたが，これは本研究で用いる株のグルコース消費速度は遅いため，グルコース濃度の変化量を読み取りやすくするためである．

また，嫌気条件を作成するため，蒸発による培地の減少を避けるために Milli Q 水を通過させた一般純度の窒素を 0.1 L/min の割合で通気した．

3. 2. 6　培養上清中のグルコース・エタノール・グリセロール濃度の測定

サンプルの分析については，取得したサンプルから遠心により菌体を取り除いた上清を用いた. グルコース濃度は, 酵素電極法バイオセンサ (BF-5i; Oji Scientific Instruments, Hyogo, Japan) を用いて測定した.

エタノールの測定は FID (Flame Ionization Detector, 水素炎イオン化型検出器) 検出器を備

えたガスクロマトグラフ (7890A; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) を用いた．カラムは Stabiliwax column (0.32-mm internal diameter, 60-m length and 1-µm thickness; Restek Co., Bellefonte, PA) を用いた．濃度定量のため，サンプルには 3-メチル 1 ブタノールを内部標準物質として混合し，測定した．グリセロールの測定は F-kit (F-kit Glycerol; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用い，マニュアルに従って行った．

3. 2. 7　ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーション

ゲノムスケール代謝モデルは，細胞内に存在する代謝物とそれに関連する代謝反応からなる代謝反応ネットワークモデルである．ゲノムスケール代謝モデルを用いることで，定常状態の仮定より規定される化学量論的制約，反応フラックスの最大値・最小値の規定およびバイオマス生産など特定の評価関数の最適化という 3 つの条件によって，細胞内の代謝反応の流れ (フラックス) を定量的に推定することができる．ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションにおいては，代謝反応の化学量論バランスと個々のフラックスのとりうる範囲を規定した上で，バイオマス生産を最大化したときの細胞内代謝フラックス分布を，線形計画法を用いて決定する．

出芽酵母では全ゲノム情報がすでに解読されており，どのような遺伝子が存在するかが明らかにされている．また，その遺伝子がコードしているタンパク質や，そのタンパク質が関わる代謝反応に関するデータベースが整備されている (*Saccharomyces* Genome Database (Weng, 2003), Comprehensive Yeast Genome Data base (Mewes et al., 2002), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Ogata et al., 1999))．本研究では，2004 年に公開されたモデルで，酵母の持つ 750 の遺伝子を考慮した 1149 の代謝反応，646 の代謝物質を含み，細胞内のサイトゾルやミトコンドリアなどのコンパートメントを考慮したことに特徴をもつ出芽酵母のゲノムスケール代謝モデルである iND750 (Duarte et al. 2004）に，乳酸生産反応

$$\text{Pyruvate[c]} + \text{NADH[c]} + \text{H}^{+}\text{[c]} \leftrightarrow \text{L-Lactate[c]} + \text{NAD}^{+}\text{[c]}$$

を追加したモデルを使用した．この式で[c]はサイトゾルにおける代謝物であることを示し，矢印は可逆反応であることを意味している．

3. 2. 7. 1　ゲノムスケール代謝モデルを用いた Flux Balance Analysis (FBA) によるシミュレーション

ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションでは，細胞内における代謝物質の濃度が時間的に変化しない定常状態を考える．定常状態では各代謝物質の生成消費速度について連立方程式を立てることができる．また，もうひとつの拘束条件として，個々の反応がとりうる最大値および最小値を設定している．これらの拘束条件によりゲノムスケール代謝モデルに含まれる代謝フラックス数を次元とする空間内でフラックスが取り得る領

域 (解空間) を規定することできる．シミュレーション結果は，これらの拘束条件から導かれる解空間に含まれる代謝状態のうち，最も効率良く細胞増殖することができるすなわちバイオマス生産フラックスが最大となるような代謝フラックス分布として出力される．

ネットワークの定常状態の仮定

本モデルでは，代謝反応の定常状態を仮定する．これは細胞内に存在する全ての代謝物質の濃度が時間的に変化しない状態のことで，この状態では細胞内の各代謝物の単位時間あたりの生成，消費速度が釣り合う．このことを，Fig. 3.1 に示すような簡単な代謝ネットワークを用いて説明する．

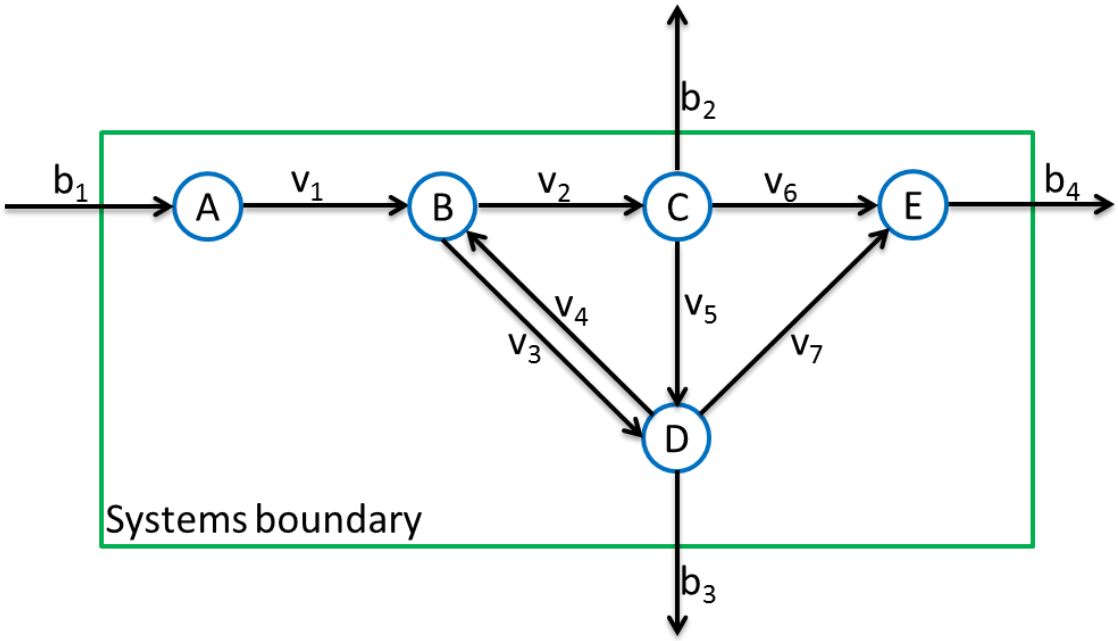

Fig. 3.1　代謝ネットワークの例

各代謝物質 (A～E) は代謝反応によって別の代謝物質に変換される．ここで，代謝反応フラックスについては，各代謝物質の生成消費速度は釣り合うという定常状態の仮定より次の式が成り立つ．

A について：$-v_1 + b_1 = 0$

B について：$v_1 - v_2 - v_3 + v_4 = 0$

C について：$v_2 - v_5 - v_6 - b_2 = 0$

D について：$v_3 - v_4 + v_5 - v_7 - b_3 = 0$

E について：$v_6 + v_7 - b_4 = 0$

これを行列および反応ベクトルで表わすと次のようになる．

$$\mathbf{S}\cdot\mathbf{v} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} v1 \\ v2 \\ v3 \\ v3 \\ v4 \\ v5 \\ v6 \\ v7 \\ b1 \\ b2 \\ b3 \\ b4 \end{bmatrix} = \mathbf{0}$$

つまり，一般的に定常状態における各代謝物質の物質収支式は反応の係数行列 (化学量論行列：**S**)と反応を要素とするベクトル **v** を用いて以下のように表現できる．

$\mathbf{S}\cdot\mathbf{v} = \mathbf{0}$

フラックスが取り得る範囲に関する拘束条件

次に，個々の代謝反応がとりうる最大値および最小値を規定する．この拘束条件は反応を要素とするベクトル **v** の各反応 v_i について次のような不等式を定義することにより与えられる．

$v_{i,\,min} \leqq v_i \leqq v_{i,\,max}$

ここで $v_{i,\,min}$ と $v_{i,\,max}$ は代謝反応 v_i がとりうるフラックスの最小値及び最大値を表す．このような条件設定はグルコースや酸素といった細胞内への物質の取り込みを定義したり，あるいは遺伝子破壊シミュレーションの際，その反応が起こらないような状態を定義したりするためにも用いる．例えば，グルコース比消費速度を 10 mmol g dry cell^{-1} h^{-1} に定めるときは

$v_{i,\,min} = 10,\ v_{i,\,max} = 10$

とする．また，経路抑制のシミュレーションの際は，その対応する反応のフラックスの上限値と下限値をともに 0 にする．すなわち

$v_{i,\,min} = 0,\ v_{i,\,max} = 0$

とする．なお，本研究で用いた iND750 モデルでは反応の可逆性についてもモデル内で与えられているので，それに従って以下のように反応の方向を定義した．

可逆な場合

$-1000 \leqq v_i \leqq 1000$

不可逆な場合

$0 \leqq v_i \leqq 1000$　(単位 mmol g dry cell^{-1} h^{-1})

ここで 1000 という数は設定するグルコース取り込み速度と比べて非常に大きい数なので，実質的に制限が無いことと等価であるとみなすことができる．

増殖速度最大化の仮定

ゲノムスケール代謝モデルで記述した定常状態におけるフラックスの関係と各フラックスに関する拘束条件の全てを満たす代謝フラックス分布は，フラックスの変数が束縛条件より多くなるため一意に決定されるとは限らず，多くの場合無数に存在する．そのため，ゲノムスケール代謝モデル用いたシミュレーションでは，代謝フラックス分布を一意に決定するために，特定の目的関数を定義し，その目的関数を最適化する線形計画問題を解くことでその条件で最適な代謝状態を推定する．

細胞は，その増殖を最大限行うように代謝状態を組織化するという考えに立つ事が可能である．そのため，ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションにおいては，通常，細胞を構成する成分により記述される「バイオマス (Biomass)」という仮想の代謝物質を設定し，この「バイオマス」の生産反応のフラックスが最大となるような細胞内代謝フラックス分布を推定する線形計画問題を解く．このような目的関数を設定することで，さまざまな生物のゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションの結果が，実際の培養実験により求められた代謝フラックス分布とよく一致するという例が多く報告されている．

iND750 では，この「バイオマス」を 1 mol 合成するのに必要な反応を以下のように定義している．

(1.1348) 13BDglcn[c] + (0.4588) ala-L[c] + (0.046) amp[c] + (0.1607) arg-L[c] + (0.1017) asn-L[c] + (0.2975) asp-L[c] + (59.276) atp[c] + (0.0447) cmp[c] + (0.0066) cys-L[c] + (0.0036) damp[c] + (0.0024) dcmp[c] + (0.0024) dgmp[c] + (0.0036) dtmp[c] + (0.0007) ergst[c] + (0.1054) gln-L[c] + (0.3018) glu-L[c] + (0.2904) gly[c] + (0.5185) glycogen[c] + (0.046) gmp[c] + (59.276) h2o[c] + (0.0663) his-L[c] + (0.1927) ile-L[c] + (0.2964) leu-L[c] + (0.2862) lys-L[c] + (0.8079) mannan[c] + (0.0507) met-L[c] + (0.000006) pa_SC[c] + (0.00006) pc_SC[c] + (0.000045) pe_SC[c] + (0.1339) phe-L[c] + (0.1647) pro-L[c] + (0.000017) ps_SC[c] + (0.000053) ptd1ino_SC[c] + (0.1854) ser-L[c] + (0.02) so4[c] + (0.1914) thr-L[c] + (0.0234) tre[c] + (0.000066) triglyc_SC[c] + (0.0284) trp-L[c] + (0.102) tyr-L[c] + (0.0599) ump[c] + (0.2646) val-L[c] + (0.0015) zymst[c]
→ (59.276) adp[c] + (58.7162) h[c] + (59.305) pi[c] + Biomass[c]

この式から計算される Biomass の組成式は $C_{35.9}H_{65.5}N_{5.59}O_{23.7}P_{0.19}S_{0.077}$ であり，このとき Biomass の分子量は 962.17 である．この式で各物質の係数は 1 mol の Biomass，すなわち 962.17 g の乾燥菌体重量に相当する菌体を生産するために必要な各分子の物質量を表す．それゆえ，比増殖速度 μ (1/h)はバイオマス生産式のもつ反応速度 V_{growth} (mmol g dry cell^{-1} h^{-1}) と Biomass の分子量 $M_{Biomass}$ (g/mol)の値を使い，以下の式を用いて求めることができる．

μ (1/h) = V_{growth}(mmol g dry cell^{-1} h^{-1})×$M_{Biomass}$(g/mol)÷1000

3. 2. 7. 2　Phenotype phase plane (PhPP) 解析

Phenotype phase planes (PhPP) は, 注目する 2 つのフラックスを変化させた際に実現しうるバイオマス生産の最大値を図示する方法で (Edwards et al., 2002; Price et al., 2004) データの解釈や実験デザインを行う際に有用である.

PhPP を描くにあたり，本研究では，グルコース比消費速度を 1 mmol g dry cell^{-1} h^{-1} に設定し，乳酸排出フラックスと酸素比消費速度のフラックスを共に 0 mmol g dry cell^{-1} h^{-1} から 2 mmol g dry cell^{-1} h^{-1} まで 0.02 刻みで変化させたときの, バイオマス生産フラックスの最大値を線形計画法により求めた.

シミュレーションおよび結果の可視化には，Matlab R2009b (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) および LINDO API (Lindo Systems, Chicago, IL, USA) を用いた.

3.3　結果

3. 3. 1　エタノール-グリセロール生産抑制株を用いた乳酸生産株 S252 の構築

通常，出芽酵母は乳酸をほとんど生産しない，そこで本研究では外来の遺伝子を高発現プラスミドにクローニングし，細胞に導入することで，乳酸生産株の構築を行った．

本研究では，大腸菌と出芽酵母のシャトルベクターである pNV11 にヒト由来の L-乳酸脱水素酵素をコードする LDHA 遺伝子を導入したプラスミド pNV11-LDHA を，エタノール-グリセロール生産抑制酵母 S245 に導入した組換え株 S252 を構築した．

3. 3. 2　S252 株の坂口フラスコを用いた振とう培養実験

構築した乳酸生産株 (S252) の乳酸生産能を確認するために，坂口フラスコを用いて好気的に培養を行った．また，比較のために同条件における BY4739 およびエタノール-グリセロール生産抑制株 (S245) の培養も行った．その結果を，Fig. 3.2 に示す．構築した S252 株は坂口フラスコを用いた振とう培養において，エタノール-グリセロール生産抑制株とほぼ同じ比増殖速度を示し，その値は野生型株 BY4739 のおよそ 3 分の 1 であった．

S252 株は乳酸を生産したが，その収率は 0.41 mol-lactate/mol-glucose であり，先行研究 (Tokuhiro et al., 2009) と比較しても著しく低かった (Table 3.4).

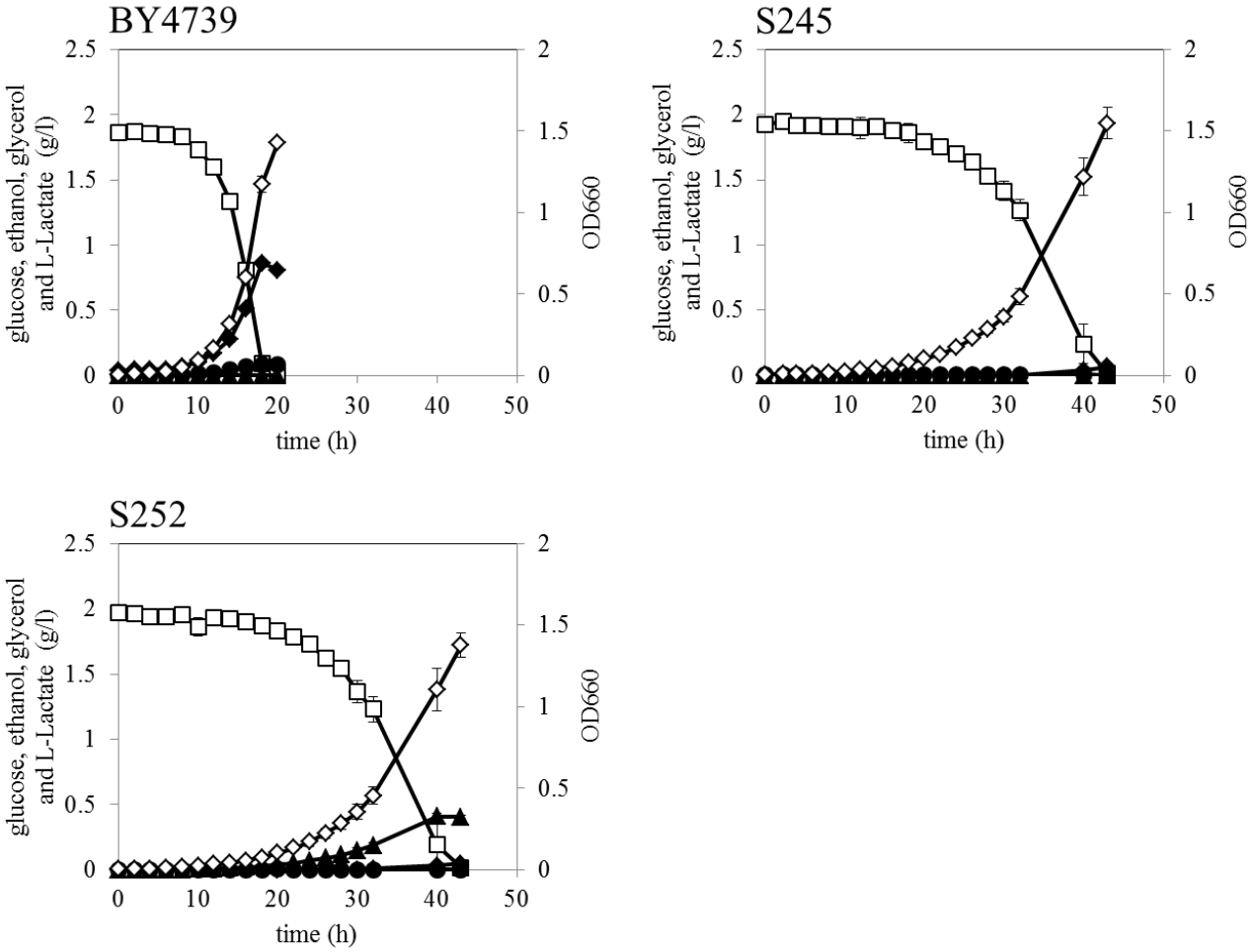

Fig. 3.2　BY4739, S245, S252 を坂口フラスコで培養した結果．OD660 (◇) およびグルコース (□), 乳酸 (▲), エタノール (◆), グリセロール (●) の濃度の経時変化を示しいている．また，各グラフは，3 回の培養実験における平均値±標準偏差を示している．

Table 3.4 坂口回分培養における各株の比増殖速度および培養終了時の生産物収率

	Strains		
	BY4739	S245	S252
比増殖速度(h^{-1}) [a]	0.299±0.007	0.135±0.000	0.134±0.001
Ethanol (mol/mol-glucose consumed) [b]	1.63±0.052	0.137±0.016	0.096±0.016
Glycerol (mol/mol-glucose consumed) [b]	0.087±0.02	未検出	未検出
L-Lactate (mol/mol-glucose consumed) [b]	未検出	未検出	0.413±0.018

各値は 3 つの独立した坂口フラスコによる平均値および標準偏差.

[a] 対数増殖期における比増殖速度. 各数値は, BY4739 のものは 2~16 h, S245 のものは 6 ~ 32 h, S252 のものは 6 ~ 32 h における培養液中の菌体濃度 OD660 から求めた.

[b] エタノールおよびグリセロールの収率は, グルコースを完全に消費した時点で生成された各代謝物質濃度から求めた.

3. 3. 3　エタノール・グリセロール生産抑制株を用いた乳酸生産の収率向上へ向けた代謝設計

3. 3. 3. 1　出芽酵母を用いた乳酸生産

本研究では効率の良い乳酸生産プロセスを構築することを目的とし, ゲノムスケール代謝モデルを用いて細胞内代謝反応のシミュレーションを行った.

出芽酵母による L-乳酸生産において理論上最も高い収率となるのは, 1 mol のグルコースから解糖系およびピルビン酸を経て 2 mol の乳酸が生産される場合である (Fig. 3.3). 仮に, この理論最大収率を達成する代謝状態を実現することができれば, 細胞に取り込まれた炭素源は全て乳酸に変換される. しかしながら, 野生型の酵母に乳酸生産経路を導入しただけでは, このような理想的な乳酸生産状態は実現されない (Dequin and Barre, 1994). その理由として, 出芽酵母の野生型では通常エタノールやグリセロール生産に関わる経路が優勢であり, これらの代謝反応が起こりやすいことがある. また生物は自らの生体構成成分を生産する反応すなわち細胞増殖に取り込んだ炭素源を使用することも高収率の乳酸生産系構築の妨げとなる. これらのうちエタノールおよびグリセロール生産に関しては, 第 2 章で構築したエタノール-グリセロール生産抑制株を用いることで解決できる. そこで本研究では, エタノール-グリセロール生産抑制株をベースとして高い収率で乳酸を生産する代謝状態はどのようなものかを探索すると共に, そのような代謝状態の実現可能性と, その実現方法を検討することにした.

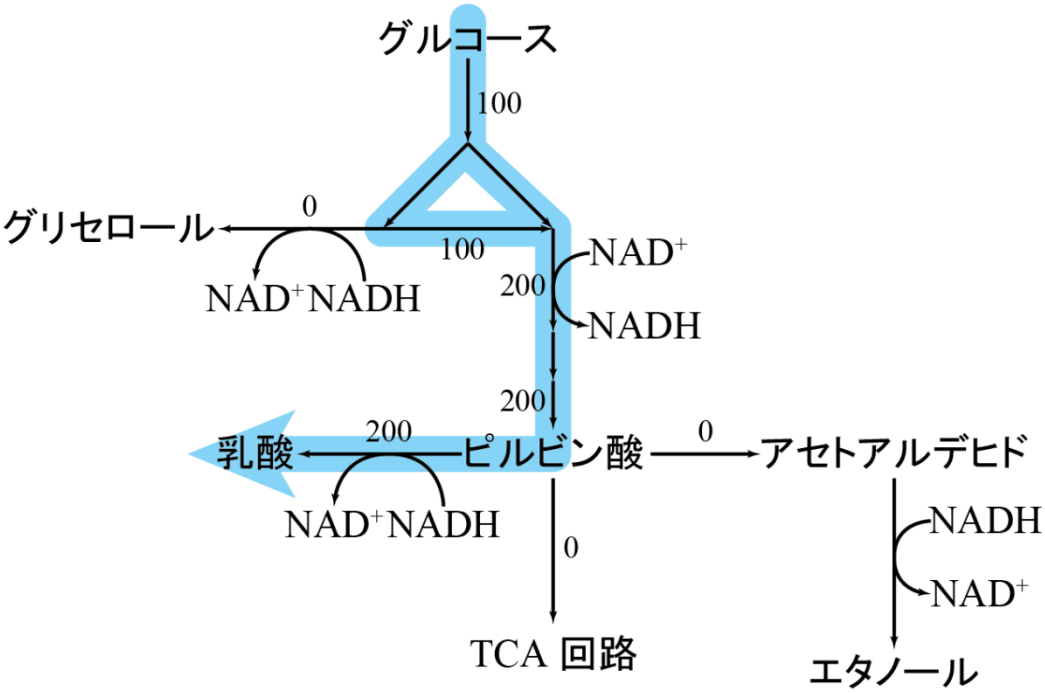

Fig. 3.3　出芽酵母のもので，理論上最も効率良く乳酸が生産される代謝フラックス　分布は取り込まれたグルコースを 100 として規格化したもの.

Fig. 3.3 に示しているグルコースが全て乳酸に変換される代謝状態は解糖系で生成される NADH と，すべての炭素が乳酸生産経路に流れる場合に乳酸生産経路で生成される NADH が釣り合っている．従ってこのような代謝が起こる場合，生体構成成分は生産されない．しかしながら，もしこの代謝経路よりも生体構成成分を生産する上で有利な代謝状態が存在する場合，そちらの代謝反応が優先的に起こる可能性が高い．ゲノムスケール代謝モデルを用いた Phenotype phase plane (PhPP) はモデルに含まれる 2 種類の代謝フラックスを様々に変化させた際に実現しうる生体構成成分バイオマスの比生産速度の最大値を図示することができるため，これを用いて乳酸生産に関する代謝経路の検討を行った．ここで，PhPP を描くにあたり着目する 2 つのフラックスとして，目的物質である乳酸の比生産速度と，酸素の比消費速度を選択した．ここで，着目するフラックスとして酸素比消費速度を選択したのは，酸素を利用することで効率良く NADH の酸化を行うことができるため，乳酸生産が担う NADH 再酸化の役割を代替できる有力な候補だからである．事実，現在知られている出芽酵母の NADH 再酸化プロセスは，1. エタノール生産経路，2. グリセロール生産経路，3. ミトコンドリア外膜に存在する NADH デヒドロゲナーゼよる NADH の呼吸酸化，4. グリセロール-3-リン酸シャトルによるサイトゾルの NADH の呼吸酸化，5. ミトコンドリア膜間腔の内膜に存在する NADH デヒドロゲナーゼによる NADH 酸化 (Bakker et al 2000) の 5 つであり，これらのうち 3, 4, 5 は，外部からとりこんだ酸素の酸化力を利用して，NADH の再酸化をおこなうプロセスである．そこで本研究では出芽酵母による乳酸生

産と酸素消費の関係性を明確にすることを目的として，ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションを行った．

3. 3. 3. 2　Phenotype phase plane (PhPP)を利用した解析

Fig. 3.4 はグルコース比消費速度を 1 mmol g dry cell^{-1} h^{-1} に固定し，乳酸比生産速度および酸素比消費速度の各々の座標でのフラックス分布をバイオマス生産量を最大化する評価関数により求め，各座標におけるバイオマス生産量を可視化したものである．このような図は Phenotype phase plane (PhPP) と呼ばれている．PhPP 上で白色の領域は化学量論式を満たしながらバイオマスを生産可能な解が存在しないことを示している．この図より酸素比消費速度が 0 のとき，すなわち嫌気状態において，細胞は乳酸生産フラックスが理論上最大の収率が達成される 2 mmol g dry cell^{-1} h^{-1} となる代謝状態を実現しうることが明らかとなった．しかしながらこの条件では，嫌気条件において乳酸生産フラックスは 0 から 2 mmol g dry cell^{-1} h^{-1} のあらゆる値をとることがわかる．この図において乳酸生産が起きていない領域ではエタノールおよびグリセロール生産経路にフラックスが流れる．そこで，これらの経路を遮断して同様のシミュレーションを行った．

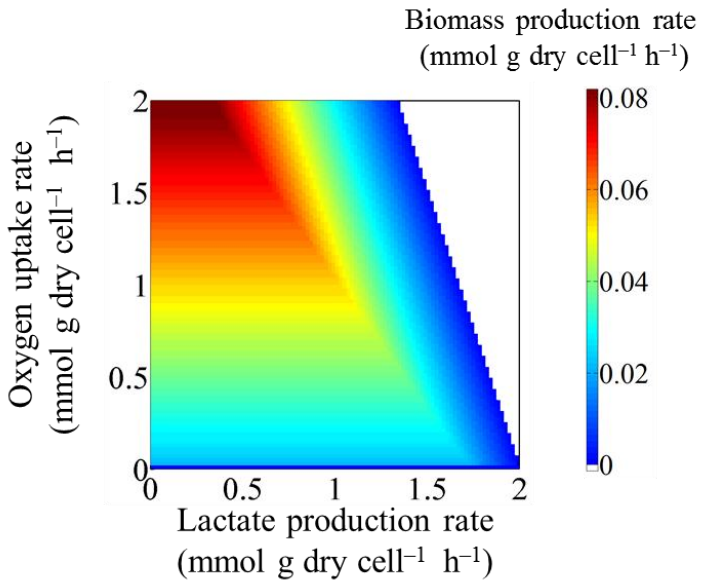

Fig. 3.4　ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーション結果．横軸を乳酸生産フラックス，縦軸を酸素消費フラックスとして解の取り得る領域を示すとともに，バイオマス生産の最大フラックスを色で表した PhPP である．カラーバーは，バイオマス生産速度 (mmol g dry cell-1 h-1) に対応する．

Fig. 3.5A は，グルコース比消費速度を 1 mmol g dry cell^{-1} h^{-1} に固定し，エタノール生産経路

ALCD2x : [c] ethanol + nad ↔ acetaldehyde + h + nadh

およびグリセロール生産経路

G3PD1ir : [c] dihydroxyacetone phosphate + h + nadh → glycerol-3-phosphate + nad

G3PD1irm : [m] dihydroxyacetone phosphate + h + nadh → glycerol-3-phosphate + nad

をゼロと設定して，描いた PhPP である．この図においても依然乳酸を生産しない条件においてとりうる代謝状態が存在することがわかった．このとき，乳酸の理論最大収率を実現する乳酸生産フラックスである 2 (mmol g dry cell^{-1} h^{-1}) となる代謝状態以外の領域においては，乳酸以外の物質を細胞外に排出することで，NADH の酸化還元バランスおよび炭素収支を満たすことがわかった．

そこで，嫌気条件において乳酸生産が最大にならない代謝状態においてどのような物質が生産されているかを，シミュレーションにより予測される代謝フラックス分布を見ることにより確認した．その結果，乳酸生産フラックスがゼロである代謝状態において，アラニン，バリン，D-ソルビトール，コハク酸を生合成する反応経路が解糖系で生成された NADH の再酸化を行う能力があることを見いだした (これらの代謝物質を Group A とする). しかしながら，通常出芽酵母によりこれらの物質が大量に生産されるという知見は存在しない (Kuyper et al., 2004; Wisselink et al., 2010; Beuermann et al., 2012). そこで，これらの生産は行われないと仮定してシミュレーションを行った．まず，Group A に含まれる物質の排出フラックスをゼロに設定してシミュレーションを行った．その結果を Fig. 3.5B に示す．シミュレーションの結果から，Group A とした代謝物質の細胞外排出のフラックスをすべてゼロに設定すると，乳酸生産フラックスの最小値が 0 でなくなることが明らかとなった．しかしながら，この条件においても，乳酸生産フラックスがとりうる範囲は 0.5 ~2 mmol g dry cell^{-1} h^{-1} の範囲のあらゆる値となり，依然取り込んだ炭素を全て乳酸に変換する以外の代謝状態を取り得ることがわかった．

次に，嫌気条件で乳酸比生産速度が最小になる代謝状態のフラックス分布を確認し，そのときに細胞外に排出しうる代謝物質を調べ，その生合成フラックスをゼロに設定して改めてシミュレーションを行うという操作を繰り返した．このような試行錯誤の結果，Table 3.3 の Group B に含まれる物質の細胞外排出フラックスをすべてゼロに設定した時点で，PhPP が Fig. 3.5C のようになり，嫌気条件では取り込んだ 1 mol のグルコースを 2 mol の乳酸に変換する代謝状態以外の解は存在しなくなった．Fig.3.5 に示された図形の形状について考察を行う．酸素供給が十分な場合たとえば Fig.3.5A の上部において，細胞は TCA サイクルなどで生成した NADH を酸化的リン酸化反応により酸素を十分に使って ATP を生成し，菌体増殖を最大化することが可能であり，このような状況においては乳酸を生産するよりもむしろ乳酸生産をできるだけ行わない方が増殖速度が高く，従って低乳酸生産が増殖最大化にとって好ましいことがわかる．この状況では，増殖と乳酸生産は完全にトレードオ

フの関係になっており，どちらかを上昇させると他方は減少する．自然な細胞では，より高い増殖速度を細胞は好むため，好気的には乳酸生産は起こらない．次に，酸素供給が中程度の際には，この酸素供給に見合う ATP 生成で増殖速度は最大化し，余剰の NADH は乳酸生産やそのたの NADH を再酸化することのできる経路によって消化される．

Fig.3.5B や C のように NADH の再酸化可能な物質の合成経路を削除していくと NADH を再酸化できない領域が発生し，結果として取りえない状態となって現れる．特に，C のように他の物質の合成経路を一切遮断することで嫌気条件において乳酸生産を最大化することで唯一細胞はとりうる状態を持つことができるという状況を生み出すことができる．逆にこのことを利用して乳酸生産を安定的に生産させることが可能な環境状態を規定することが可能となった．

以上のシミュレーション結果から，エタノール・グリセロール生産抑制株に乳酸脱水素酵素を導入した組換え株が，嫌気条件においてグルコース消費を行い，かつ GruopA および GruopB の物質の生産が起こらないとき，起こりうる代謝は取り込んだグルコースが全て乳酸に変換されるという代謝のみであるという予測結果が得られた．

この結果に基づき，本研究では構築した乳酸生産株 S252 を嫌気条件で培養し，その挙動を確認することとした．

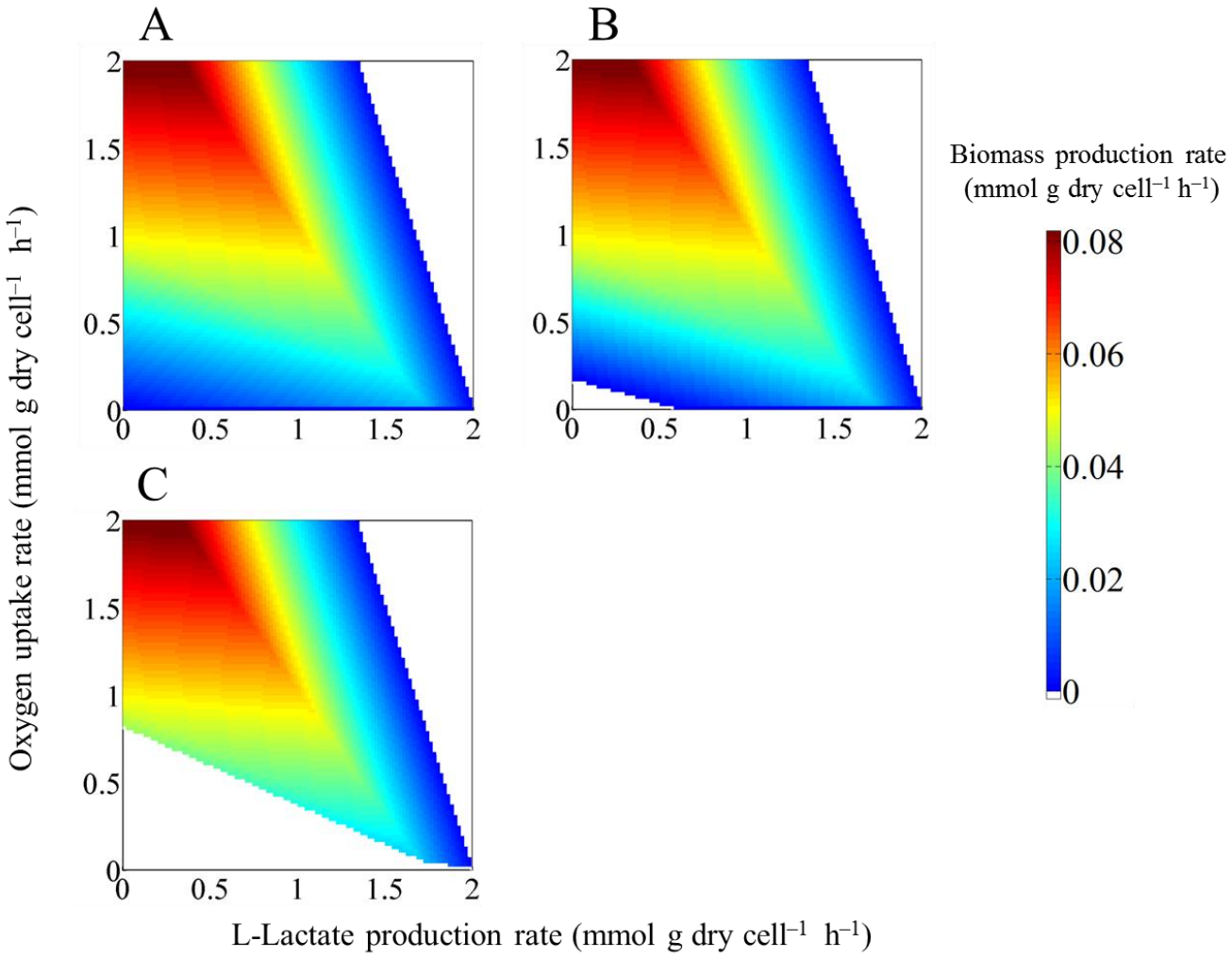

Fig. 3.5　ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーション結果．いずれも，横軸を乳酸生産フラックス，縦軸を酸素消費フラックスとして解の取り得る領域を示すとともに，バイオマス生産の最大フラックスを色で表した PhPP である．カラーバーは，バイオマス生産速度 (mmol g dry cell-1 h-1) に対応する．Fig. 3.5A はエタノール-グリセロール生産経路を削除して描いた各代謝物質の PhPP であり，Fig. 3.5B は Fig. 3.5A における制限に加えて Group A に含まれる物質の生産も制限して行ったもの. Fig. 3.5C は Fig. 3.5A および Fig. 3.5B における制限に加えて Group B に含まれる物質の生産も制限して行ったものである.

Table 3.3　結果 3. 3. 3. 2 で行った解析で，乳酸生産と競合する物質として見出された物質.

代謝物質
Group A
アラニン
バリン
D-ソルビトール
コハク酸
Group B
メチオニン
イソロイシン
リンゴ酸
フマル酸
スレオニン
システイン
フェニルアラニン
プロリン
D-グルコサミン-6 リン酸
パントテン酸
チロシン
オルニチン
アスパラギン酸
チミジン 3 リン酸
トリプトファン
アスパラギン

3. 3. 4　S252 株の嫌気条件における回分培養

ゲノムスケール代謝モデルによるシミュレーションによると，乳酸の理論最大収率を達成させる代謝状態は酸素消費がない状態で実現されると考えられる．そこで，嫌気条件での培養系をジャーファーメンターを用いて作成し，結果 3. 3. 3 で行ったシミュレーションで予想された理論最大収率を実現させることが可能であるか検証した．なお，S245 および S252 株は嫌気条件で増殖できないことが予め行った予備実験により判明していたので，本研究では坂口フラスコを用いた振とう培養で予め増殖させた菌体を培地に接種し，菌体濃度の高い状態でのグルコース消費や乳酸生産などを測定した．また，嫌気条件は，ジャーファーメンターに窒素を 0.1 L/min で通気することで構築した．

BY4739 株の嫌気条件における培養結果

Fig 3.6 は BY4739 を窒素嫌気的に培養した結果である．この結果から，酵母の野生型株では嫌気条件においてもバイオマスの生産が見られ，エタノールおよびグリセロールが生産されることが確認された．

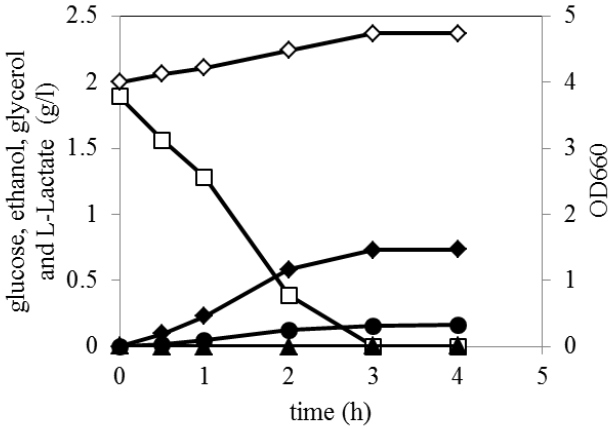

Fig. 3.6　BY4739 を嫌気条件で培養した結果. OD660 (◇), およびグルコース (□), 乳酸 (▲), エタノール (◆), グリセロール (●) の濃度の経時変化を示している．

S245 および S252 株の嫌気条件における培養結果

Fig. 3.7 は, S245 (エタノール-グリセロール生産抑制株) および S252 (乳酸生産株) を嫌気的に培養した結果である．この結果から，嫌気条件において S245 株はグルコース取り込み並びに代謝物質生産を全く起こさないことが確認された．一方 S252 株では，乳酸生産経路の導入によりグルコースの消費が回復すること，またそれに伴い乳酸を生産することが確認された．グルコースを完全に消費したときの乳酸の収率はおよそ 2 mol-lactate/mol-glucose であった．しかしながら，Fig. 3.6 に示されるように BY4739 が 3 時間で 2 g のグルコースを消費し切るのに対して，S252 株においては 2 g のグルコースを完全に消費するためには 100 時間以上必要であった．

S252 の嫌気条件における培養挙動の再現性を確認するために，さらに 2 回培養実験を行った．その結果，条件に揃えて行ったにもかかわらず，グルコース消費速度に最大 2 倍程度の違いが見られた (Table 3.5)．また，S252 のグルコース消費速度は BY4739 と比較して 50 ~ 100 倍程度遅くなった．しかしながら，培養実験終了時の乳酸生産収率は，いずれの培養実験においても 2 mol-lactate/mol-glucose であることがわかった．そこで，計 3 回の培養結果より得られた，各サンプリングポイントにおけるグルコース消費量と乳酸生産量の関係をプロットした (Fig. 3.8)．このプロットにおいて直線的な相関が成り立つとき，その回帰直線の傾きが乳酸の収率に相当する．その結果，いずれの培養実験においてもプロットは傾きがおよそ 2 の直線で回帰することができ, 対糖収率 2 mol-lactate/mol-glucose という理論

最大収率を達成させることができていることが明らかとなった．この培養においては坂口フラスコを用いた回分培養で見られたエタノールの生産がみられなかった．これは，嫌気条件において各株は NADPH の生産にフラックスを回すことができず，NADPH 依存性アルコールデヒドロゲナーゼが働くことができなかったためである可能性が考えられる．

この結果は実際の嫌気培養においても，とりうる代謝がモデルにより予測された乳酸を理想的に生産する代謝状態のみであることを支持する結果である．

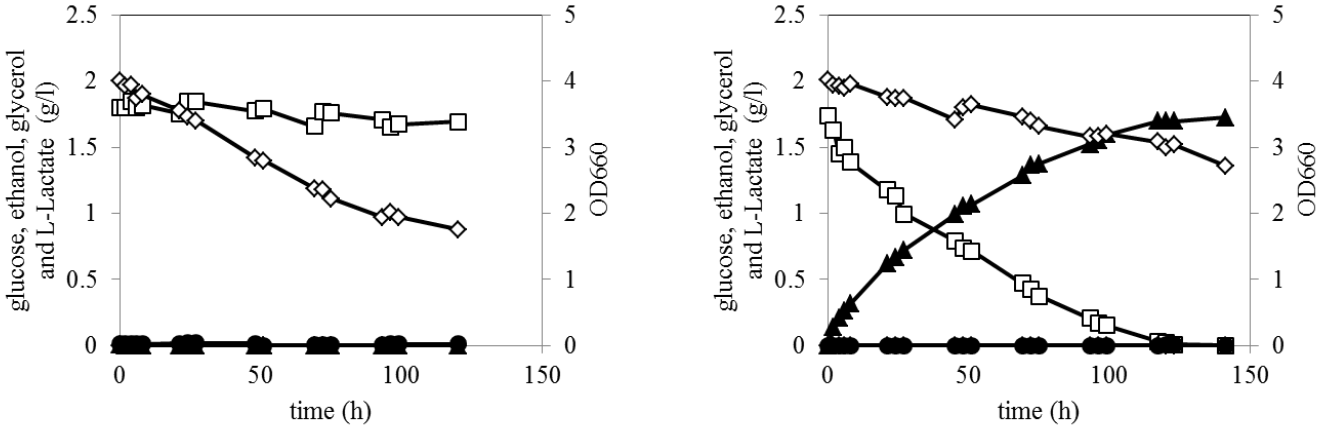

Fig. 3.7　S245, S252 を嫌気条件で培養した結果．OD660 (◇) およびグルコース (□)，乳酸 (▲)，エタノール (◆)，グリセロール (●)の濃度の経時変化を示している．

Table 3.5 培養開始と終了あるいはグルコース枯渇時から算出した平均グルコース消費速度

Strain	培養中の平均グルコース消費速度 ($g\ l^{-1}\ h^{-1}$)
BY4739	0.6300
S252 [a]	0.0082
	0.0112
	0.0121

[a]S252 の培養は同様の条件で 3 度行った．

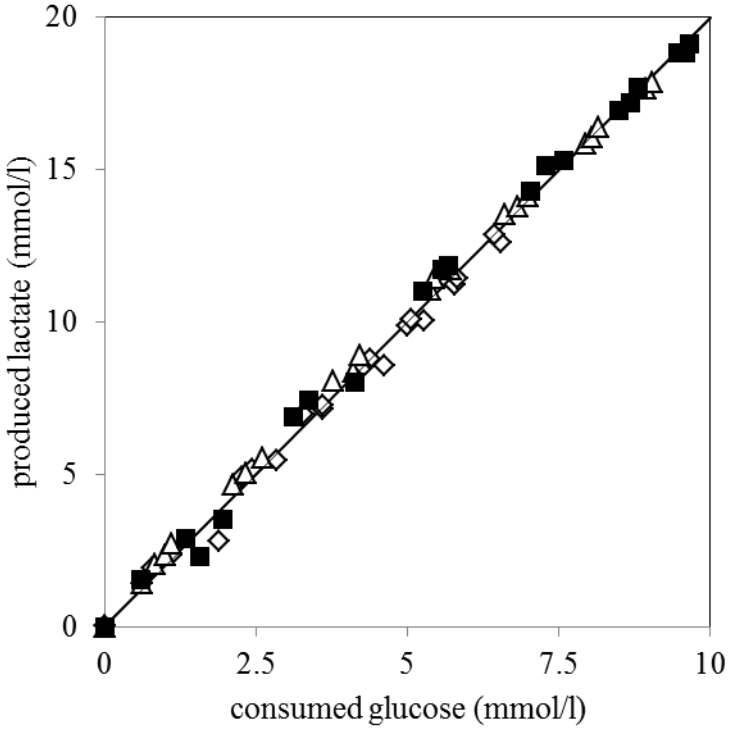

Fig. 3.8 嫌気培養における S252 のグルコース消費と乳酸生産の関係． 3 回の培養結果から算出したグルコース消費と乳酸生産の関係性．図上で同じシンボルで描かれているものは同じ培養の実験結果から得られたデータであることを示している．また，図中の直線は傾き 2 の直線を示し，各点がこの直線上に乗ることから乳酸の収率は 2 mol/mol-glucose となる．

3.4　考察

本章では，出芽酵母を用いた乳酸生産について，理論最大収率を達成させるような細胞内代謝状態の設計を行うとともに，設計した代謝状態を実現する培養条件を，ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションにより予測し，実際の培養実験により検証した．

出芽酵母を用いた乳酸生産を行う上で，解糖系で生産される NADH が重要な役割をはたすことは先行研究により明確であったため，第 2 章で構築したエタノール-グリセロール生産抑制株を用いて高収率な乳酸生産を実現させるような代謝状態を，ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションを用いて考察した．その結果，エタノールおよびグリセロール生産経路を破壊した出芽酵母は，嫌気条件において理論上最大の収率で乳酸を生産する可能性が見いだされた．さらに，出芽酵母の実際の培養実験に関する知見に基づいて，出芽酵母による排出が報告されていない乳酸の競合物質の生産経路を遮断するというモデルの改変を行った．ここで置いた，乳酸の競合物質の遮断は大きな仮定であり，必ずしも保証されるものではないが，この仮定を置くことで嫌気条件において乳酸を生産するような代謝状態が理論最大収率を達成させる唯一の解となる可能性が示唆された．この予測結果を検証するため，第 2 章で構築したエタノール-グリセロール生産抑制株にヒト由来の乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子を導入して乳酸生産株を構築し，その乳酸生産能を嫌気条件での培養実験により評価した．その結果，構築した乳酸生産組換え株は，最終的にグルコースを 2 mol/mol-glucose で乳酸に変換でき，理論最大収率を達成させることに成功した．

本研究では第 2 章で構築したエタノール-グリセロール生産抑制株および，ゲノムスケール代謝モデルを用いた代謝設計を利用し，先行研究を収率の面で上回る乳酸生産プロセスを構築した．しかしながら，本研究で構築した乳酸生産プロセスを実際の物質生産に応用する際に問題点となりうる点として，その生産速度の遅さがある．嫌気条件におけるグルコース消費速度は野生型と乳酸生産株で 60 倍以上も差があった．ここで見られるような速度の低下は，エタノールおよびグリセロール生産経路の破壊のみによっても見られるものである (van Maris et al 2004b; Skory 2003)．その原因としてはアセトアルデヒドの蓄積，グリセロール生産ができないことによる脂質合成能の低下，あるいは浸透圧ストレスに対する耐性低下などが考えられるが，ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションや本研究で行った培養実験から，その正確な原因を特定することは困難である．今後，本研究で構築した乳酸生産プロセスを利用するための生産速度改善のためには，細胞内代謝物質の定量等を通して原因を明らかにすることが必要となると考えられる．

3.5　結言

ゲノムスケール代謝モデルによる予測より出芽酵母を用いた乳酸生産プロセスを構築する際，エタノール-グリセロール生産経路をゼロとした場合，嫌気条件においては，取り込んだ基質であるグルコースを全て乳酸に変換する代謝状態しかとりえないことが予測された．　そこで第 2 章で構築したエタノール-グリセロール生産抑制株 (S245) に乳酸生産酵素発現プラスミドを導入し，得られた株を窒素の通気により嫌気条件を作成したジャーで培養することで高収率 (2 mol/mol-glucose) 乳酸生産プロセスを実現した．

本章で行った PhPP を用いて目的物質が生産される以外の代謝状態を持たない条件を探索するという手法は，乳酸以外の物質を生産する条件を探索する場合にも応用可能であると期待される．第 4 章においては，本章で乳酸生産の際の副産物として排除した物質群について，乳酸と同じ手法を用いてそれらの物質を生産できる可能性，あるいは生産候補となった物質間の差異について検討する．

第 4 章　ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションによるエタノール・グリセロール生産抑制株を用いた有用物質生産の実現可能性の解析

4. 1　緒言

本研究では第 2 章においてエタノールおよびグリセロール生産経路に関連する遺伝子を破壊することでそれらの物質の生産を安定的に抑制した株の構築を行い，さらに第 3 章においてそれを用いた高収率乳酸生産プロセスを構築した．第 3 章における乳酸生産プロセス構築では，ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションにより，乳酸の理論最大収率が達成される代謝状態をまず設計した．そしてその後，予測された代謝状態を実現する培養条件を実際の実験系に適用して培養を行うことで，理論最大収率で乳酸を生産するプロセスを構築することに成功した．本章では，第 3 章で行ったのと同様のゲノムスケール代謝モデルを用いた代謝フラックスのシミュレーションを乳酸以外の物質でも行い，今後の代謝設計および物質生産プロセス構築への応用について議論する．

第 3 章で用いた Phenotype phase plane (PhPP) は，基質比消費速度および着目する反応経路の有無という条件を設定し，着目物質の比生産速度と酸素比消費速度を様々に変化させた際のバイオマス比生産速度の最大値を描いた図である．PhPP を用いることで取り込んだ炭素源から生成される特定の物質の生産フラックスが，理論上とりうる範囲を可視化することが可能である．第 3 章では乳酸を着目物質とし，エタノール-グリセロール生産経路抑制株の PhPP を描いた．その結果，酸素消費が無い条件下においては，エタノール-グリセロール生産経路をゼロとした場合，酵母は取り込んだグルコースの全てが乳酸に変換される以外の代謝状態を実現できないことを見出した．次にここで得られた予測結果を実験的に検証するため，第 2 章で取得したエタノール-グリセロール生産抑制株に乳酸生産反応を導入した株を構築し，嫌気的な系で培養した．その結果モデルによる予測通り，構築した株は取り込んだグルコースを全て乳酸に変換する代謝を示すことを確認した．このような PhPP を用いた代謝解析は，乳酸以外の有用物質生産を実現する代謝状態を探索する目的にも応用可能であると考えられる．

そこで本章では，まず本研究で使用している出芽酵母のゲノムスケール代謝モデルである iND750 (Duarte et al., 2004) に含まれている代謝物質のうち，理想的な乳酸生産状態を探索した際に見出された，乳酸と同じくエタノール-グリセロール生産経路が行なっていた NADH 再酸化の役割を代替可能な物質群 (Table 3.3) に着目し，これらの物質が生産される場合のフラックス分布の解析を行った．

次に iND750 モデルに含まれておらず，出芽酵母が生産経路を持っていない 1,3-プロパンジオールを例に，その生産を可能とするフラックス分布のシミュレーションを試みた．1,3-

プロパンジオールは近年プラスチックの原料として注目されており，外来の遺伝子を導入することで出芽酵母に生産させる試みも行われている物質である (Rao et al., 2008).

これらの物質が生産される際のフラックス分布より，その共通点や課題を見出し，その生産可能性を議論する.

4. 2　実験方法

4. 2. 1　1,3-プロパンジオール生産に必要な代謝経路の導入

出芽酵母は 1,3-プロパンジオールの生合成経路を持っていない. そこで本研究ではグリセロールからの 1,3-プロパンジオール生合成に関わる以下の代謝反応を iND750 モデルに追加した. 実際に出芽酵母にこれらの経路を触媒する酵素を導入した例としては Ma らによる出芽酵母を用いた 1,3-プロパンジオール生産の研究 (Ma et al., 2010) があり，そこでは *Klebsiella pneumoniae* 由来の酵素 (*dhaT*, *dhaB*) が利用されている.

[c] : Glycerol ↔ 3-Hydroxypropionaldehyde + H_2O

[c] : 3-Hydroxypropionaldehyde + NADH + H^+ ↔ 1,3-Propanediol + NAD^+

1,3-Propanediol [c] ↔ 1,3-Propanediol [e]

1,3-Propanediol [e] →

1 つ目の反応はグリセロールデヒドラターゼ (*dhaB*)，2 つ目の反応は 1,3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (*dhaT*) がそれぞれ触媒する反応を示している. 3 つの目の反応は，細胞外へ 1,3-プロパンジオールを排出する反応を示している．なお，[c]はサイトゾルに，[e]は細胞外に存在する物質あるいは反応であることを示している．また，4 つめの反応はゲノムスケール代謝モデルにおいて系外への排出を示す反応である．また，反応を結ぶ矢印は，反応の可逆性を示しており，今回の反応では排出反応以外可逆と仮定した.

4. 2. 2　Phenotype phase plane (PhPP) 解析

本章における PhPP も，第 3 章と同様，特に記述がないシミュレーションについては，グルコース比消費速度を 1 mmol g dry $cell^{-1}$ h^{-1} に設定し，目的物質の比生産速度と酸素の比消費速度を共に 0 mmol g dry $cell^{-1}$ h^{-1} から 2 mmol g dry $cell^{-1}$ h^{-1} まで 0.02 刻みで変化させたときの，バイオマス生産フラックスの最大値を線形計画法により求めた．最終的な結果は，横軸を目的物質の比生産速度，縦軸を酸素の比消費速度とした座標平面上に，それぞれの場所におけるバイオマス生産フラックスの最大値を色情報で表示し，可視化した.

シミュレーションおよび結果の可視化には，Matlab R2009b (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) および LINDO API (Lindo Systems, Chicago, IL, USA) を用いた.

4. 3　結果

第 3 章において，PhPP を用いた乳酸生産条件探索を行う過程で，生産することにより乳酸生産と同様 NADH の酸化を行うことができる物質，すなわち Table 3.3 に含まれる物質の排出のフラックスはゼロとしてシミュレーションを行った．これらの物質の生産をゼロとしてもよいとした判断は，これまでの出芽酵母を培養した実験に関する多くの報告において, Table 3.3 に含まれる物質の生産は無視できるレベルである (Kuyper et al., 2004; Wisselink et al., 2010; Beuermann et al., 2012) ことをその根拠とした．一方で，これらの物質のうち，特に Group A に含まれる個々の物質は，外来の LDH を導入することで生産されるようになった乳酸の場合と同様に，必要な代謝経路の導入を行う等の経路の増強を行うことで嫌気条件において生産される代謝状態が実現する可能性があると予測される物質である．すなわち野生型の出芽酵母は生産できなくとも，外来遺伝子の導入や発現増強などにより必要な代謝経路を整備することでこれらの物質が生産される様になる可能性は存在する．そこで，ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションにより予測されるこれらの物質を生産するときの代謝フラックス分布を詳しく見ることにより，その実現可能性を検証した．

4. 3. 1　Group A に属する物質の生産シミュレーション

第 3 章で行った PhPP を用いた解析において，Group A としたアラニン，バリン，コハク酸，ソルビトールの嫌気条件における生合成反応はそれぞれ単独で，本来エタノールやグリセロールの生合成反応が担っていた役割を完全に代替することができる．そこで，これら 4 つの物質に対して，第 3 章で乳酸に対して行ったのと同様に，PhPP を用いた解析を行った．

Fig. 4.1A はそれぞれ，エタノール，グリセロール生産経路を抑制した条件において，アラニン，バリン，コハク酸，ソルビトールの比生産速度を横軸，酸素の比消費速度縦軸にとりそれらを様々に変化させた時のバイオマス比生産速度の最大値を求めたものである．この図より，Group A に含まれる物質は酸素非消費速度が 0 の場合において，高い収率で生産される代謝状態を実現しうることを確認できた．この図でアラニン，バリン，コハク酸，ソルビトールの嫌気条件における最大収率はそれぞれ 2, 1, 1, 0.888 (mol/mol-glucose) となる．しかしながら，乳酸生産の検討を行った場合と同様，これらの PhPP では着目物質の比生産速度がとりうる範囲に幅が存在し，各々の物質を全く生産しない代謝状態もとりうることがわかった．そこで，乳酸生産のシミュレーションで行ったように，着目物質以外の Group A に含まれる物質および乳酸の生産をゼロとしてシミュレーションを行った．その結果が Fig. 4.1B である．このシミュレーション結果より，Group A に含まれる物質の嫌気条件における生産領域は，乳酸とは異なり，着目物質以外の Group A に含まれる物質および乳酸

生産を抑制した時点で，アラニン，バリン，コハク酸の生産がとりうる代謝状態は 1 点に定まり，ソルビトールに関しては一定の範囲を持つものの高収率の代謝状態をとることがわかった．この差異は，アラニン，バリン，ソルビトールについては，その生産経路上で ATP の生成消費バランスが釣り合っているのに対し，乳酸では生成された ATP を消費する反応が決まっていないことによると推測される．すなわち，乳酸生産では，ATP をどの反応で利用するかの自由度がある分だけより幅広い代謝の可能性を保持していると解釈できる．コハク酸については自由に消費できる ATP が存在するが，同様に制約条件となっている別の要素が存在するため代謝経路が取り得る自由度が低くなっていると考えられる．このような PhPP の形状を決める要素としては NADH の生成消費に関する制約や着目物質を生産する上での炭素の流れる道筋が関与していると考えられるが，詳細を解明するにはさらなる研究が必要である．

ここでさらに，Group B に含まれる物質の生産を抑制してシミュレーションを行うと Fig. 4.1C のようになり，PhPP における着目物質を生産しない領域が絞られるという結果となった．この結果をまとめると，Group A に属する物質は，エタノールおよびグリセロール生産経路および着目物質以外の Group A に含まれる物質の生産をゼロとすると, 酸素非消費速度が 0 の場合において当該物質の比生産速度に単一あるいは狭い領域のみの可能な代謝状態をもち，かつ，その代謝状態においてはグルコースとして取り込んだ炭素の大部分が目的物質に変換される代謝状態をとる，ということができる．通常の培養条件において，これら 4 つの物質が生産されることはほとんどないが，遺伝子操作による代謝経路の強化などを行うことで，嫌気条件下で生産される可能性は有している．

次節から，各物質が生産される条件下における代謝フラックス分布を確認してゆくが，一つ共通点として，Group A に含まれる 4 つの物質のうち，アラニン，バリン，コハク酸を生産する場合のフラックス分布は取り込まれたグルコースが全てピルビン酸に変換される代謝状態をとっていた (Fig. 4.2).

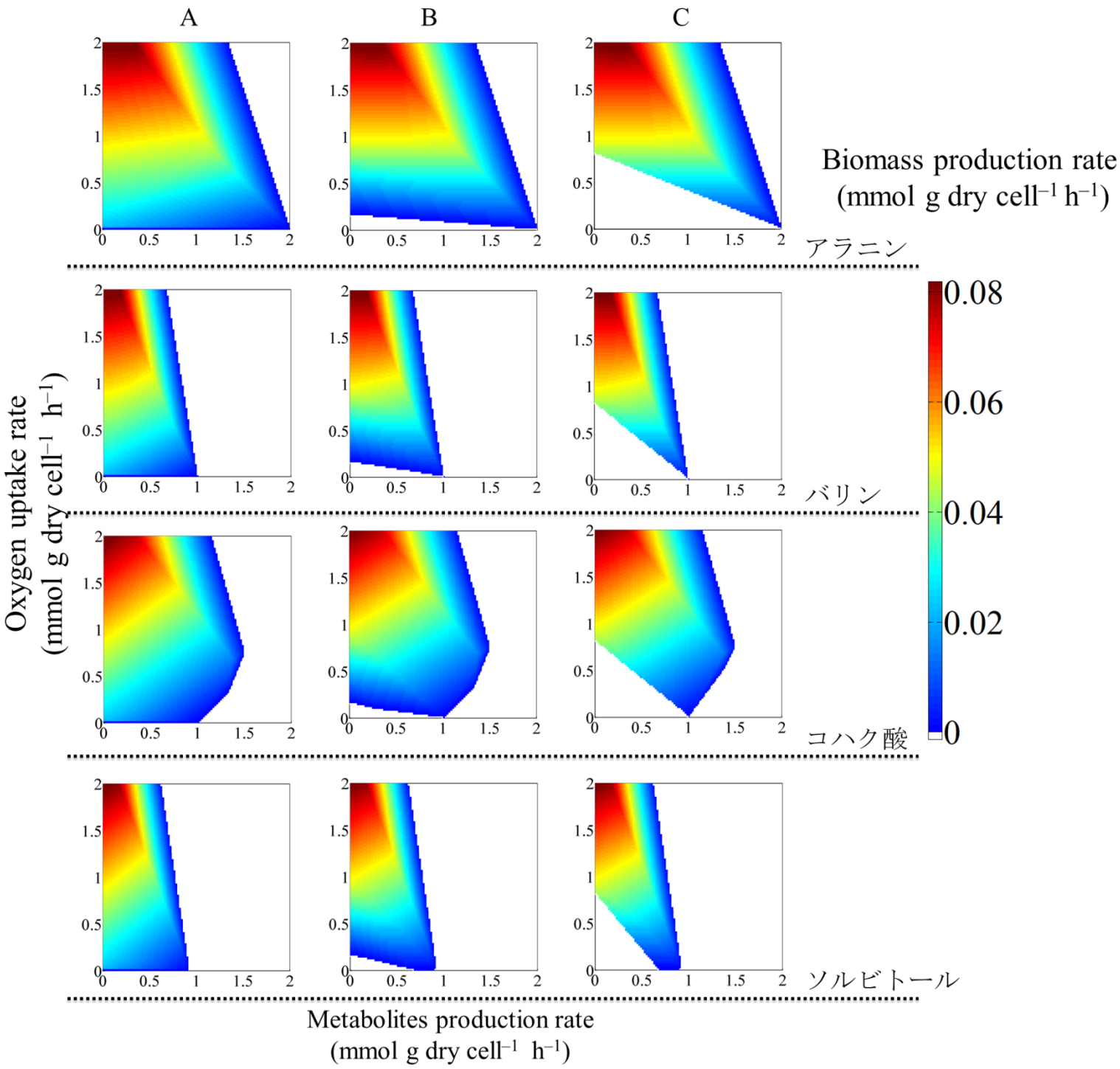

Fig. 4.1　シミュレーションにより求められた酸素の比消費速度 (縦軸), 各代謝物質の比生産速度 (横軸) および各条件においてとりうるバイオマス生産フラックスの最大値 (色) の関係を示した PhPP. カラーバーは, バイオマス生産速度 (mmol g dry cell^{-1} h^{-1}) に対応する. この図の縦のグループについて, Fig. 4.1A はエタノール-グリセロール生産経路を削除して描いた各代謝物質の PhPP であり, Fig. 4.1B は Fig. 4.1A における制限に加えて Group A に含まれる物質の生産も制限して行ったもの. Fig. 4.1C は Fig. 4.1A および Fig. 4.1B における制限に加えて Group B に含まれる目的物質の生産も制限して行ったものである.

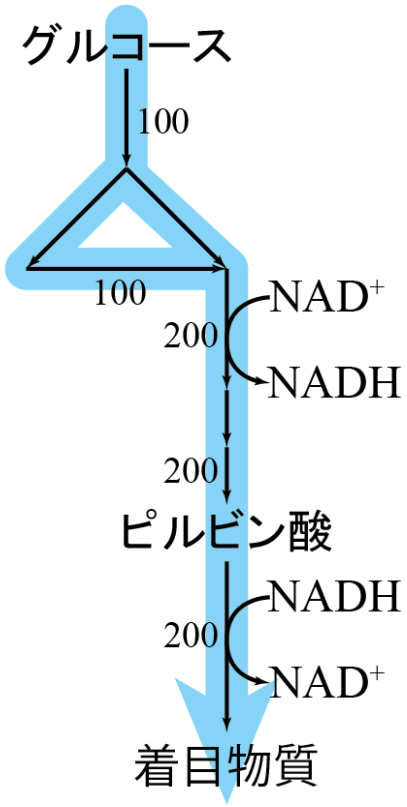

Fig. 4.2　予測されたアラニン，バリン，コハク酸生産の代謝状態で共通のフラックス．ここに示したフラックス分布は取り込まれたグルコースを 100 として規格化したもの．取り込まれた炭素が全てピルビン酸に変換され，取り込まれた 1 mol のグルコースに含まれる 6 つの炭素が開裂し，3 つの炭素よりなるピルビン酸が 2 mol 生産される状態となっている．

4. 3. 1. 1　アラニン生産のシミュレーション

iND750 モデルを用いて，エタノール-グリセロール生産経路および Table 3.3 に含まれる物質のうちアラニン以外の細胞外排出フラックスをゼロに設定し，アラニンの生産フラックスをさまざまに変化させたときのバイオマス生産フラックスの最大値をシミュレートした．その結果を，Fig. 4.1C (アラニン) に示した．この図より，エタノール-グリセロール生産経路が遮断されている場合，Table3.3 に含まれる物質のうち，アラニンのみが生産可能ならば，嫌気条件においてとりうる代謝状態はアラニン収率が 2 (mol-alanine/mol-glucose) となる状態のみであることがわかる．この時の代謝フラックス分布は Fig. 4.3 のようになる．

この代謝状態において，アラニン生産の起点となるのはピルビン酸である．取り込みにおけるグルコースフラックスを 100 とした場合，ピルビン酸合成のフラックスは 200 となる．このとき，解糖系でピルビン酸が生成される過程で， NADH が生じる．ピルビン酸はアラニントランスアミラーゼ (*ALT1*) によりグルタミン酸からアミノ基を受け取り, アラニンに変換され，細胞外に排出される．このとき，アラニンの生産フラックスは 200 となる．また，グルタミン酸は α-ケトグルタル酸に変換される．ここで生じた α-ケトグルタル酸はグルタミン酸シンターゼ (*GLT1*) によりアミノ基を受け取ってグルタミン酸に再生され, 同時にグルタミンがグルタミン酸に変換される．このとき，NADH の NAD^+への酸化を伴う．さらに，ここで生じたグルタミン酸はグルタミンシンターゼ (*GLN1*) により外部から取り込まれたアンモニウムイオンを利用してグルタミンに再生される．したがって，嫌気条件において，エタノール-グリセロール生産抑制株は 1 mol のグルコースから理論上最大 2 mol のアラニンを生産することが可能であると予測される．すなわちアラニンの理論最大収率は 2 mol-alanine/mol-glucose である．

一方，先行研究における実際のアラニン生産ではアラニンデヒドロゲナーゼ (AlnDH) という以下の反応を触媒する酵素が報告されている (Jojima et al., 2010).

$$\text{L-alanine} + H_2O + NAD^+ \leftrightarrow \text{pyruvate} + NH_4 + NADH + H^+$$

出芽酵母はこの酵素を保持していないが，本研究ではこの反応をモデルに組み込み，Gruop A および Group B が生産されない条件下，かつ Fig. 4.3 で起きているようなグルタミン酸などが関与するループが働かないよう *ALT1* により触媒される反応を削除して PhPP を描いた．その結果を Fig. 4.4 に示す．この図より，酸素消費が無い条件下においては，AlnDH を導入した株も，エタノール-グリセロール生産経路をゼロとした場合，酵母は取り込んだグルコースの全てがアラニンに変換される以外の代謝状態を実現できないことがわかる．この時の代謝フラックス分布はピルビン酸が AlaDH により触媒される反応で直接アラニンに変換されるものとなっている. この結果より, 外来の AlaDH を導入することで *ALT1, GLT1, GLN1* という出芽酵母が元々保持するが活用されていない 3 つの反応を利用することなく，一段階の反応でアラニンを生産するプロセスが実現できる可能性が示唆される．これは第 3 章で乳酸生産を行ったケースと類似しており，外来のアラニン生産酵素を導入することにより効率的なアラニン生産系の構築が期待できる．

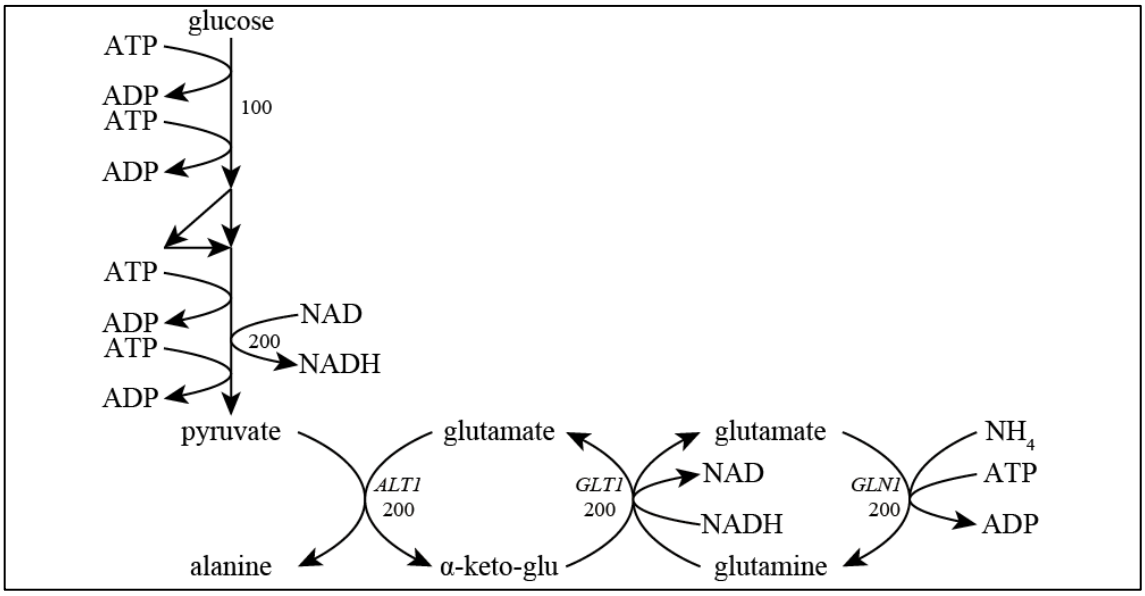

Fig. 4.3　嫌気条件においてグルコースからアラニンが理論最大収率で生産されるときのフラックス分布　図のフラックスはグルコース取り込みを 100 として正規化しており，フラックスがゼロでない経路のみを表示した．

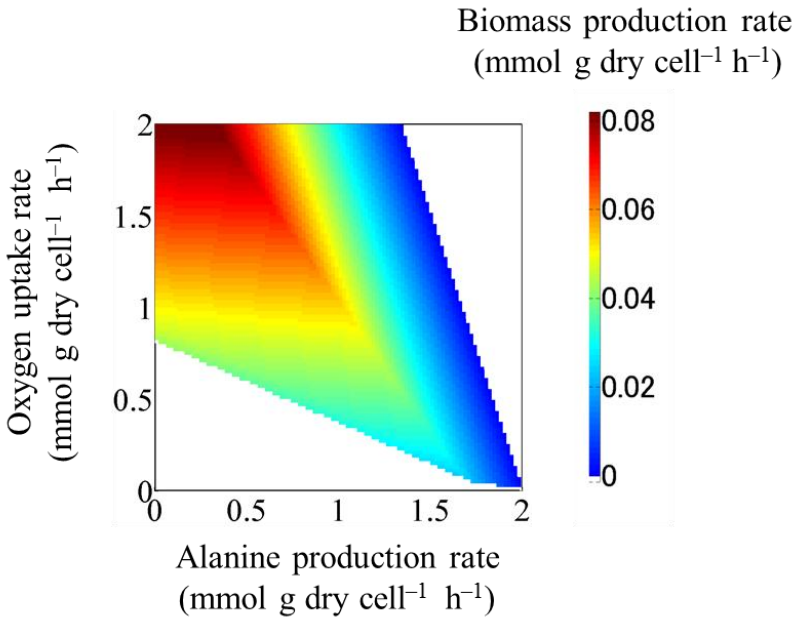

Fig. 4.4　アラニンデヒドロゲナーゼ反応を追加した場合のアラニン生産の PhPP．シミュレーションにより求められた酸素の比消費速度 (縦軸), 各代謝物質の比生産速度 (横軸) および各条件においてとりうるバイオマス生産フラックスの最大値 (色) の関係を示した PhPP．カラーバーは，バイオマス生産速度 (mmol g dry cell^{-1} h^{-1}) に対応する．

4. 3. 1. 2　バリン生産のシミュレーション

iND750 モデルを用いて，エタノール-グリセロール生産経路および Table 3.3 に含まれる物質のうちバリン以外の細胞外排出フラックスをゼロに設定し，バリンの生産フラックスをさまざまに変化させたときのバイオマス生産フラックスの最大値をシミュレートした．その結果を，Fig. 4.1C (バリン) に示す．この図より，エタノール-グリセロール生産経路が遮断されている場合，Table 3.3 に含まれる物質のうち，バリンのみが生産可能ならば，嫌気条件においてとりうる代謝状態はバリン収率が 1 (mol-valine/mol-glucose) となる状態のみであることがわかる．この時の代謝フラックス分布は Fig. 4.5 のようになる．

この代謝状態において，バリン生産の起点となるのは，上述のアラニンと同じくピルビン酸である．取り込まれたグルコースの取り込みフラックスを 100 とした場合，ピルビン酸生産のフラックスは 200 となる．バリン生産の場合，まずピルビン酸がオキサロ酢酸に変換される補充経路に 100 のフラックスが流れる，そしてオキサロ酢酸はリンゴ酸デヒドラターゼ (*MDH2*) によりリンゴ酸に変換される．このとき，NADH が NAD^+へと酸化される．細胞質で生成されたリンゴ酸はミトコンドリアに運ばれ，ミトコンドリア内でピルビン酸に戻される．また，ピルビン酸は直接ミトコンドリア内へ輸送することもでき，100 のフラックスがこの経路でミトコンドリア入る．ミトコンドリア内で 2 分子のピルビン酸が結合して一分子の (S)-2-Acetolactate となり，この分子は複数の反応を経て 3-Methyl-2-oxobutanoate (3mob) に変換される．生成された 3mob はサイトゾルに運ばれ，バリントランスアミナーゼ (*BAT2*) によりグルタミン酸からアミノ基を受け取り, バリンに変換される．生成された α-ケトグルタル酸はグルタミン酸シンターゼ (*GLN1*) により NADH の酸化とともにグルタミン酸に再生される．なお，1 mol の 3mob は 2 mol のピルビン酸から合成され，1 mol の 3mob から 1 mol のバリンが生成されるので，嫌気条件でバリンは理論最大収率である 1 (mmol-valine/mol-glucose)で生産されると予測される．

先行研究においてバリン生産を報告しているものとしては Blombach らによる *Corynebacterium glutamicum* を用いた研究がある (Blombach et al., 2008)．この研究において利用される経路も Acetolactate を経由する同様の経路であり，論文内で報告されている収率は 0.86 (mol-valine/mol-glucose) である. これは酸素が存在する環境下における流加培養により達成された収率であるが，本研究で予測されたバリン生産プロセスを実現することが出来れば，より高い収率でバリンを生産する出芽酵母が見込まれる．

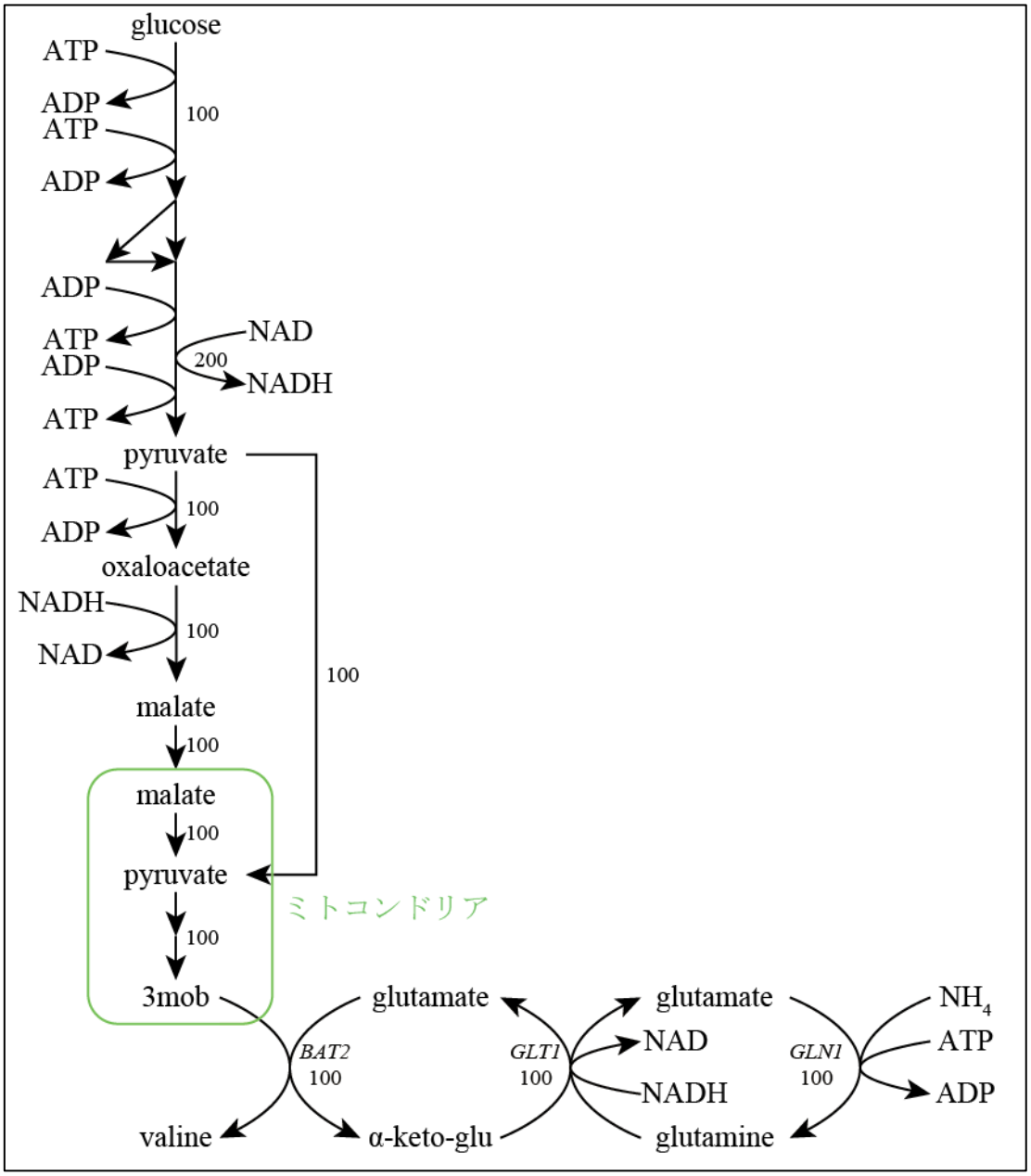

Fig. 4.5　嫌気条件においてグルコースからバリンが理論最大収率で生産されるときのフラックス分布　図のフラックスはグルコース取り込みを 100 として正規化しており，フラックスがゼロでない経路のみを表示した.

4. 3. 1. 3　コハク酸生産のシミュレーション

iND750 モデルを用いて，エタノール-グリセロール生産経路および Table 3.3 に含まれる物質のうちコハク酸以外の細胞外排出フラックスをゼロに設定し，コハク酸の生産フラックスをさまざまに変化させたときのバイオマス生産フラックスの最大値をシミュレートした．その結果を，Fig. 4.1C (コハク酸) に示す．

この図より，コハク酸の対糖収率が最大になるのは，酸素比消費速度がおよそ 0.75 mmol g dry cell^{-1} h^{-1} であるときで，その生産収率は 1.5 mol-succinate/mol-glucose であった．ただし，この酸素比消費速度においては，コハク酸の生産収率は 0〜1.5 mol-succinate/mol-glucose の範囲のあらゆる値を取り得ると予測される．通常細胞は自身の増殖を可能な限り大きくするように代謝が最適化される細胞内代謝状態を好むとされる (Edwards et al., 2001; Fong et al., 2003) ので，酸素比消費速度がおよそ 0.75 mmol g dry cell^{-1} h^{-1} の場合には，細胞はバイオマス生産のフラックスが大きく，コハク酸生産のフラックスが少ない代謝状態をとろうとすると予想される．よって，このような酸素取り込み条件で大きなコハク酸生産フラックスをもつ代謝状態を実現するに当たっては．強力なコハク酸排出系をドライブするメカニズムを整備するなどの工夫が必要であると考えられる．

一方嫌気条件においては，エタノール-グリセロール生産経路が遮断されている場合，Table 3.3 に含まれる物質のうち，コハク酸のみが生産可能ならば，嫌気条件においてとりうる代謝状態はコハク酸収率が 1 (mol-succinate/mol-glucose) となる状態のみであることがわかる．この時の代謝フラックス分布は Fig. 4.6 のようになる．コハク酸生合成経路で起点となるのは，上述のアラニンおよびバリンと同じくピルビン酸である．取り込まれたグルコースの取り込みフラックスを 100 とした場合, ピルビン酸生産のフラックスは 200 となる．コハク酸生産の場合，ピルビン酸からアセトアルデヒドを経て細胞外に排出される反応に 100 流れる. 一方残りの 100 のフラックスがピルビン酸カルボキシキナーゼにより CO_2 と結合してオキサロ酢酸に変換される反応に流れる．オキサロ酢酸はリンゴ酸に変換され，この反応と共役することで解糖系で生産された NADH の半分が再酸化される．生じたリンゴ酸はミトコンドリアに運ばれ，ユビキノールの酸化と共役する反応でフマル酸に変換される．ここで生じたユビキノンは解糖系で生産された NADH の半分量の再酸化を伴ってユビキノールに再生される. 生成されたフマル酸はコハク酸に変換される. このようにして 1 mol のコハク酸が生成されるので, 嫌気条件でコハク酸は収率 1 mmol-succinate/mol-glucose で生産される．

現時点で報告されている出芽酵母を用いたコハク酸生産の知見としては Raab らによるものがあり (Raab et al., 2010)，そこで報告されているコハク酸生産の収率は 0.11 (mol-succinate/mol-glucose) である．この論文で報告されている株においても以前エタノール生産がコハク酸収率を増加させる際の主な障害となっている．従って嫌気条件によって達成されると期待される収率 1 (mol-succinate/mol-glucose) でも従来研究に対して高収率であるといえる．

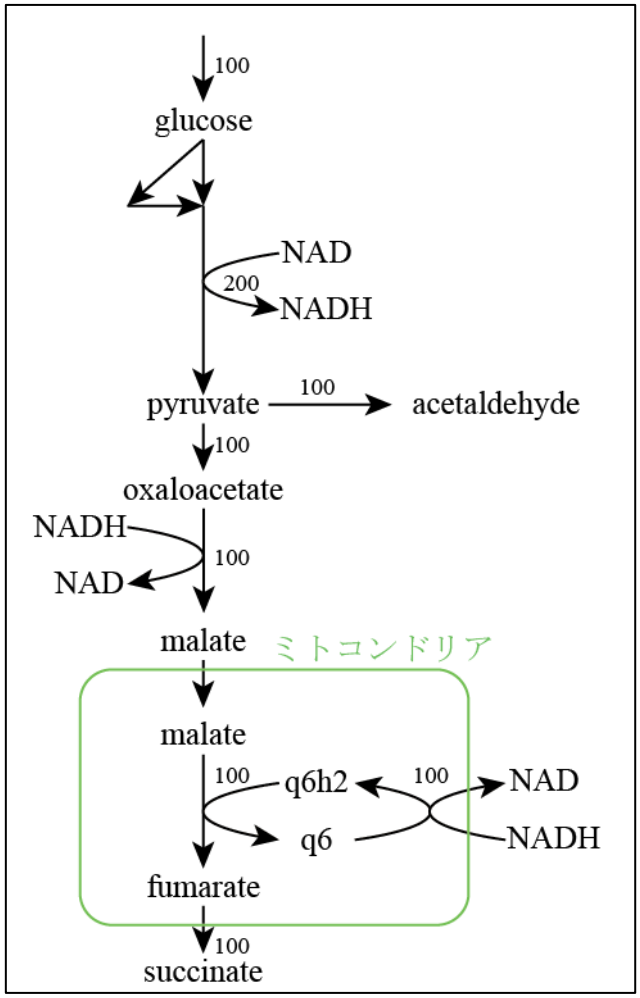

Fig. 4.6　嫌気条件においてグルコースからコハク酸が理論最大収率で生産されるときのフラックス分布　図のフラックスはグルコース取り込みを 100 として正規化しており，フラックスがゼロでない経路のみを表示した.

4. 3. 1. 4　ソルビトール生産のシミュレーション

iND750 モデルを用いて，エタノール-グリセロール生産経路および Table 3.3 に含まれる物質のうちソルビトール以外の細胞外排出フラックスをゼロに設定し，ソルビトールの生産フラックスをさまざまに変化させたときのバイオマス生産フラックスの最大値をシミュレートした．その結果を，Fig. 4.1C (ソルビトール) に示す．この図より，エタノール-グリセロール生産経路が遮断されている場合，Table 3.3 に含まれる物質のうち，ソルビトールのみが生産可能ならば，嫌気条件においてとりうる代謝状態はソルビトール収率が 0.667 ~ 0.888 (mol-alanine/mol-glucose) と範囲を持つことがわかる．この時の代謝フラックス分布を議論する．

嫌気条件においてソルビトールの生産が最小となるのは Fig. 4.7A に示したような代謝フラックス分布をとるときである．このとき，グルコースとして取り込まれたフラックスを 100 とするとソルビトール生産に 67 流れる．また，解糖系に 33.3 流れることになり，解糖系下流では 6 個の炭素を持つフルクトース 1,6-ビスリン酸が 2 分子の 3 炭素のグリセルアルデヒド 3 リン酸となり，物質量の相対値で与えられるフラックスは 67 流れることとなる．ソルビトールを生産する際に生成された $NADP^+$はグルタミン酸が α-ケトグルタル酸に変換される反応によって NADPH に再生される．生産されたα ケトルグルタル酸は NADH およびグルタミンと反応してグルタミン酸に再生される．この反応と共役することで解糖系で生成される NADH の再酸化を行なっている．生成されたグルタミンは ATP を利用してグルタミン酸に戻される．解糖系に流れるフラックスはアセトアルデヒドが最終産物となり細胞外に排出される．

一方, ソルビトール収率が最大となるのは酸素比消費速度が 0 mmol g dry $cell^{-1}$ h^{-1} であるときの 0.888 mol/mol-glucose である．この時起きているソルビトール生産状態におけるフラックスについてみる．この時の細胞内フラックス分布は Fig. 4.7B のようになる．取り込まれたグルコースのうち大部分 (グルコース取り込みとの相対値 89) はまずソルビトールに変換される．この時生じた $NADP^+$はペントースリン酸経路，解糖系の先にあるアセトアルデヒドが酢酸に変換される反応およびグルタミン酸が α-ケトグルタル酸に変換される反応によって NADPH に再生される．また，解糖系を流れるわずかなフラックス (グルコース取り込みとの相対値 11) によって生じる NADH は *GLT1* によって触媒される反応によって NAD^+に再酸化される．

ソルビトール生産でとりうる代謝フラックス分布のうち，ソルビトール生産量が最小の場合のフラックス分布は, 乳酸, アラニン, バリン, コハク酸生産とおなじく解糖系の NADH 再酸化の変則パターンと言える．一方ソルビトール生産量が最大の場合のフラックス分布は，NADPH とペントースリン酸経路が主役となる，全体の収支がとれた別のタイプの代謝状態であると言える．

先行研究において出芽酵母を用いたソルビトール生産で特筆すべきものは無いが，*Corynebacterium glutamicum* を用いたソルビトール生産における理論最大収率は 67%とされ

ている (Wisselink et al., 2005; Ladero et al., 2007). これらの論文の中で，そのような収率を示す根拠は述べられていないが，収率 67%とは Fig. 4.7A に示したような代謝でソルビトールが生産されると時の値と同じであり，これと類似の酸化還元バランスを持った代謝経路を想定していると考えられる．一方，本研究で示されたレドックスバランスを満たしながらソルビトールを生産可能な代謝状態の最大値は 89%であり，理論上はより効率の良い生産状態が存在することを示した.

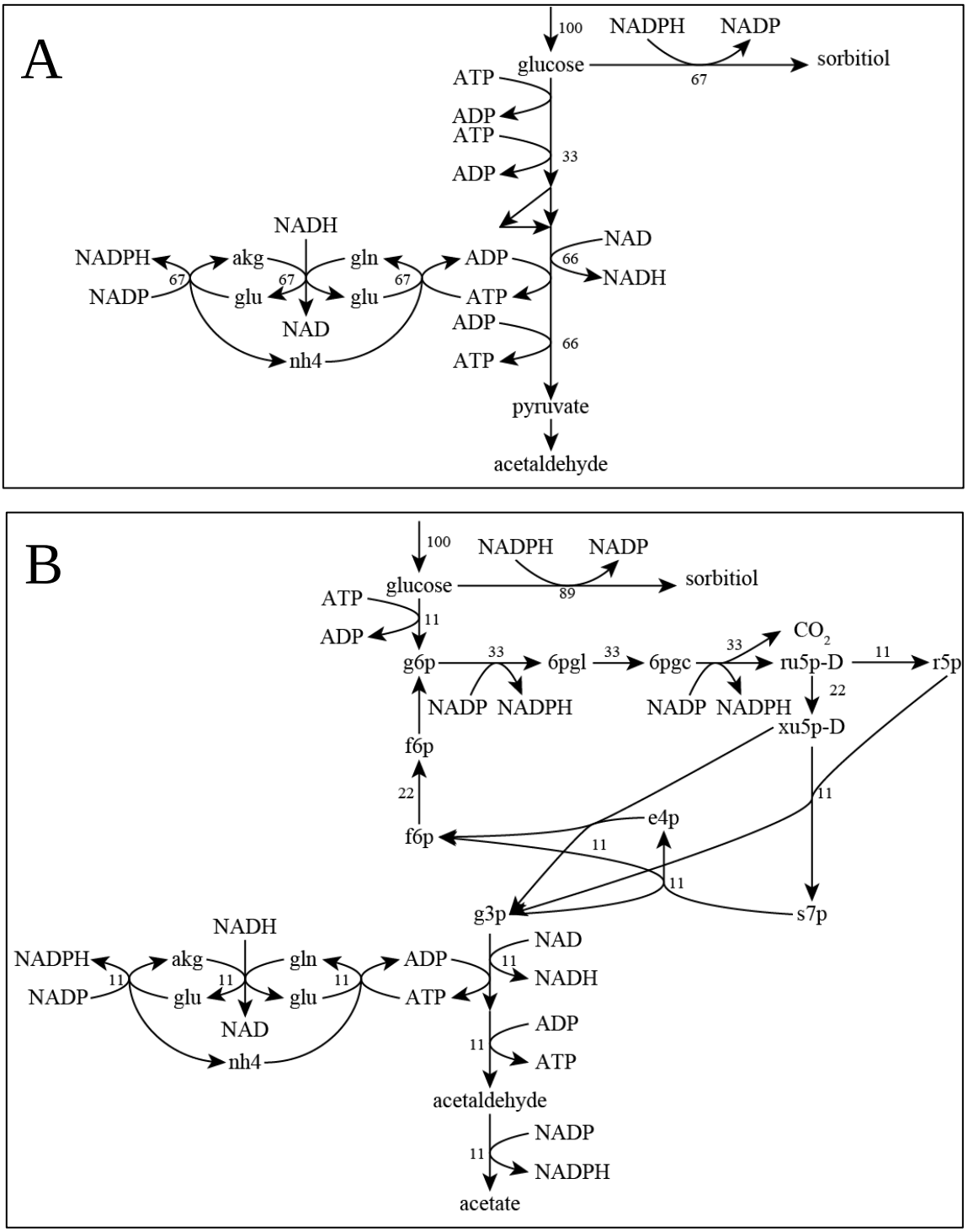

Fig. 4.7　嫌気条件においてグルコースからソルビトールが生産される場合のフラックス分布　図のフラックスはグルコース取り込みを 100 として正規化しており，フラックスがゼロでない経路のみを表示した．ソルビトール生産のフラックスは嫌気条件において一定の範囲とりうるため，ソルビトール生産が最小の際のフラックス分布を A 図に，最大のもののフラックス分布を B 図に示す．

4. 3. 2　Group B に属する物質の生産シミュレーション

第 3 章で行った解析において，単独ではエタノール-グリセロール生産が行なっている役割，すなわち解糖系で生成された NADH の酸化を完全に代替することができないが，乳酸生産に影響を与える物質として特定された物質群を Group B とした. ここでは Group A および Group B に属する物質の生産を制限し, 横軸に Group B に含まれる物質の比生産速度を設定し，PhPP を描くシミュレーションを行った (Fig. 4.8). いずれの物質においても PhPP 上に一定の解空間を持つことがわかる．また，Fig. 4.9 に例示したように，酸素比消費速度がある特定の値となるとき，目的物質を生産する唯一の代謝状態を取り得るという共通点をもつことが明らかとなった．この結果から，本研究のようなシミュレーションを行うことにより，Group B に属する代謝物質を生産したい場合においても，必要な酸素供給条件とそのときの理論的な生産フラックスや細胞内代謝フラックス分布を知ることが可能であると考えられる．さらに，PhPP より理論上とりうる着目物質排出フラックスと酸素取り込みの関係性を読み取ることが可能である．ここで得られたデータもまた，今後の物質生産を行う上で示唆を与えると期待される．しかしながら，GruopB の生産は GruopA と比べて厳密な酸素非消費速度のコントロールが必要であり，生産プロセス構築の難易度は高くなると考えられる. Table 4.1 にゲノムスケール代謝モデルから予測された各物質が生産される際の最大収率と，先行研究により報告された収率を示す．ここで生産の可能性が予測された物質のうち，今回の結果ではアミノ酸が多く含まれていたため，*C. glutamicum* や *E. coli* による生産が試みられているものが多かったが，多くの先行研究では本研究で予測された理論最大収率には達していなかった．本研究で提案している物質生産の設計法は出芽酵母以外の微生物にも応用可能であり，PhPP を用いた代謝設計は他の微生物のモデルでも検討に値すると考えられる.

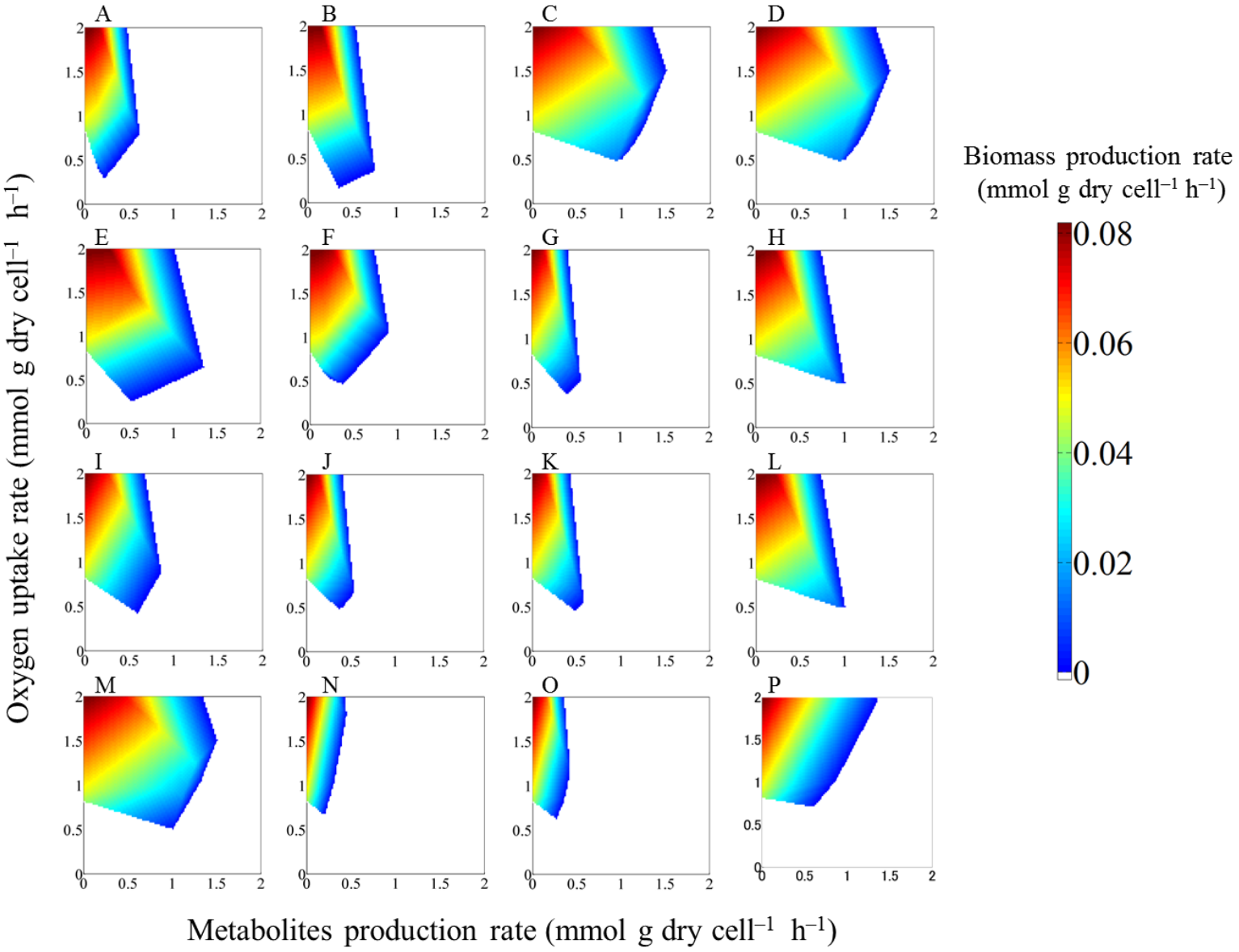

Fig. 4.8　酸素比消費速度，対応する各代謝物質の比生産速度およびバイオマス比生産速度の関係性を描いた PhPP．各々の図は出芽酵母のシミュレーション結果で，グルコース比消費速度を 1 mmol g dry cell^{-1} h^{-1} に固定し，エタノール生産経路とグリセロール生産経路へのフラックスをゼロに設定した上で, 酸素の比消費速度と Group B として見出された物質の比生産速度を様々に変化させた際に実現しうるバイオマス生産の最大値を示している．カラーバーは，バイオマス生産速度 (mmol g dry cell^{-1} h^{-1}) に対応する．

各図は以下の物質と対応している. A：メチオニン, B：イソロイシン, C：リンゴ酸，D：フマル酸，E：スレオニン，F：システイン，G：フェニルアラニン，H：プロリン，I：D-グルコサミン-6-リン酸，J：パントテン酸，K：チロシン，L：オルニチン，M：アスパラギン酸，N：チミジン 3 リン酸，O：トリプトファン，P：アスパラギン

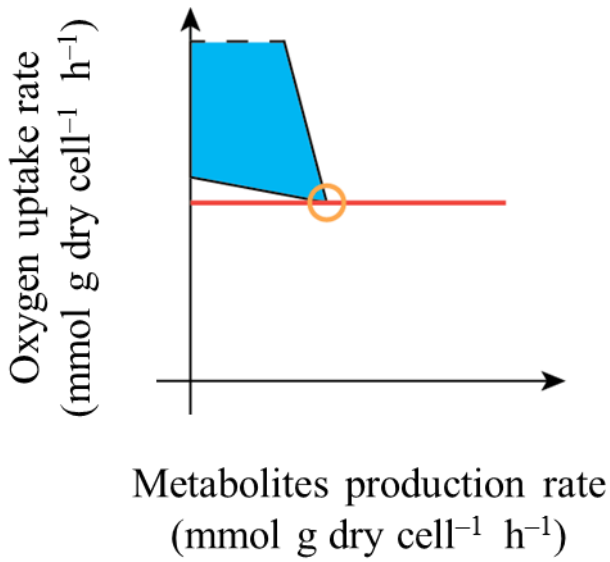

Fig. 4.9　Group B の含まれる物質に共通する性質．一定の酸素取り込み速度をもつ場合，着目物質を生産する唯一の解をもつ．

Table 4.1　GroupB に属する物質のモデルより予測される生産可能最大収率および代表的先行研究のリスト

物質	モデルより予測される最大収率 (mol/mol-glucose)	使用生物	報告されている収率 (mol/mol-glucose)	引用論文
メチオニン	0.61	-	-	-
イソロイシン	0.75	*Corynebacterium glutamicum*	0.73	Yin et al., 2012
リンゴ酸	1.5	*Aspergillus flavus* *Saccharomyces cerevisiae*	1.26 0.42	Battat et al., 1991 Zelle et al., 2008
フマル酸	1.5	*Rhizopus oryza* *S. cerevisiae*	1.32 0.08	Cao et al., 1996 Xu et al., 2012
スレオニン	1.34	-	-	-
システイン	0.89	*Escherichia. coli*	0.08	Takagi et al., 1999
フェニルアラニン	0.54	*E. coli*	0.26	Zhou et al., 2010
プロリン	1	-	-	-
D-グルコサミン-6リン酸	0.85	-	-	-
パントテン酸	0.53	*C. glutamicum*	微小	Hüser et al., 2005
チロシン	0.57	*E. coli*	0.10	Lütke-Eversloh and Stephanopoulos, 2007
オルニチン	1	*C. glutamicum*	微小	Hwang et al., 2008
アスパラギン酸	1.5	-	-	-
チミジン 3 リン酸	0.44	-	-	-
トリプトファン	0.42	-	-	-
アスパラギン	1.35	-	-	-

4. 3. 3　エタノール・グリセロール生産抑制株による 1,3-プロパンジオール生産のシミュレーション

これまで述べてきたゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションは，iND750 モデルに元々含まれている代謝物質の生産に関するものだった．しかしながら，同様のシミュレーションにより，宿主となる細胞が生産経路を持たない物質の生産についても議論することができる．すなわち，ベースとなる宿主生物のゲノムスケール代謝モデルに，生産させたい物質の生合成や排出にかかわる代謝反応を加え，シミュレーションを行うことで，その目的物質生産の可能性や生産時のフラックス分布を定量的に予測することが可能である．そのような外来の経路を導入するケースの一例として，本研究では，近年プラスチックの原料として着目されており，出芽酵母はその生合成経路を持たない 1,3-プロパンジオール (Nakamura and Whited, 2003; Ma et al., 2010) の生産に必要な代謝反応をゲノムスケール代謝モデルに組み込んでシミュレーションを行った．シミュレーションはエタノール-グリセロール生産経路および Table 3.3 に含まれる物質を生産できないという条件の下で行った．

その結果を Fig. 4.10 に示す．まず，グルコースを単一炭素源としてエタノール-グリセロール生産経路破壊株に 1,3-プロパンジオール生産経路を導入しておこなったシミュレーションでは，1,3-プロパンジオールが生産される代謝状態は存在しないことがわかった (Fig. 4.10A)．しかしながら，ここでグリセロールの取り込みを自由とすると，シミュレーション結果は Fig. 4.10B のようになり，嫌気条件において 1,3-プロパンジオールを生産する代謝状態を唯一の可能な代謝状態として持つようになることを確認した．このときの 1,3-プロパンジオール生産状態では，1 mol のグルコースと 2 mol のグリセロールを取り込み，2 mol の 1,3-プロパンジオールに変換する代謝状態となっている．このときの細胞内代謝フラックス分布を見ると，取り込んだグルコースは解糖系を経てすべてアセトアルデヒドに変換され，排出される状態をとっている．そして，この過程で生じた NADH を再酸化するために，グリセロールが取り込まれ 1,3-プロパンジオールに変換されるというフラックス分布となっていた (Fig. 4.11).

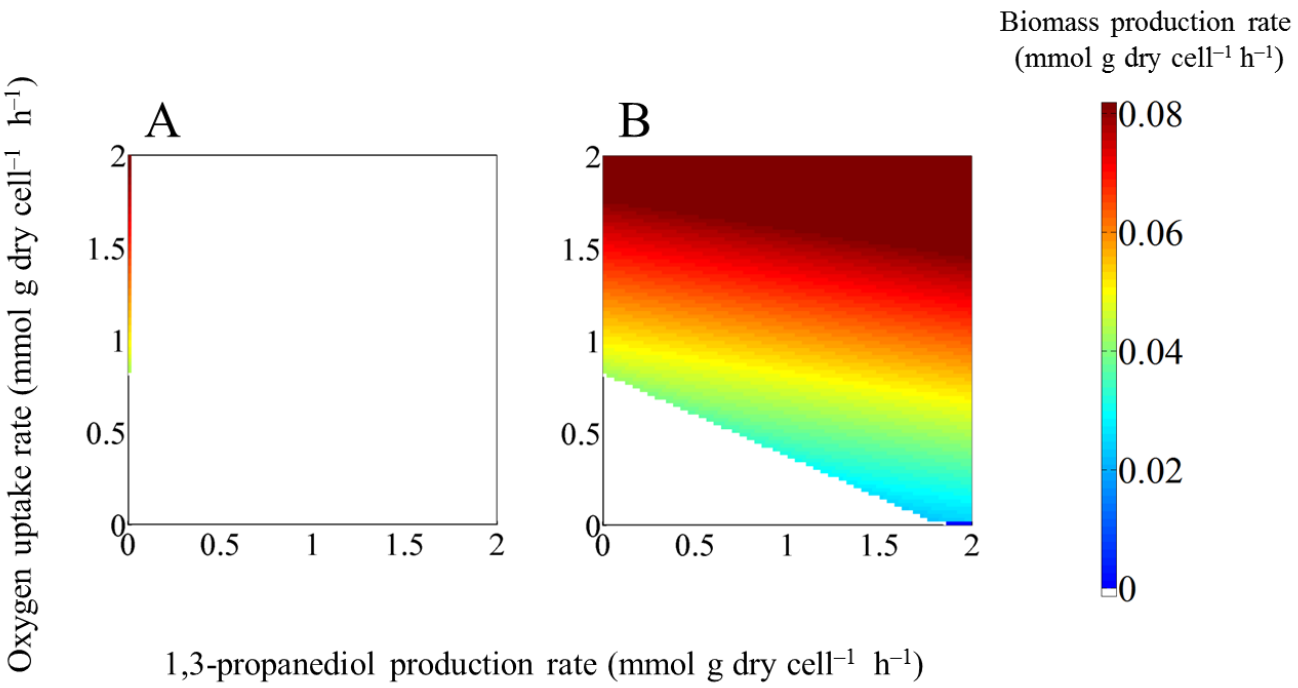

Fig. 4.10　酸素比消費速度，1,3-プロパンジオール比生産速度およびバイオマス比生産速度の関係性を描いた PhPP．この図は出芽酵母のシミュレーション結果で，グルコース比消費速度を 1 mmol g dry cell^{-1} h^{-1} に固定し，酸素の比消費速度と 1,3-プロパンジオール比生産速度を様々に変化させた際に実現しうるバイオマス生産の最大値を示している．各図はどちらもエタノール生産経路とグリセロール生産経路へのフラックスをゼロに設定して行ったシミュレーションの結果である．Fig. 4.10A ではグリセロールの取り込みが不可となっており，Fig. 4.10B ではグリセロールの取り込みを自由としている．カラーバーは，バイオマス生産速度 (mmol g dry cell^{-1} h^{-1}) に対応する．

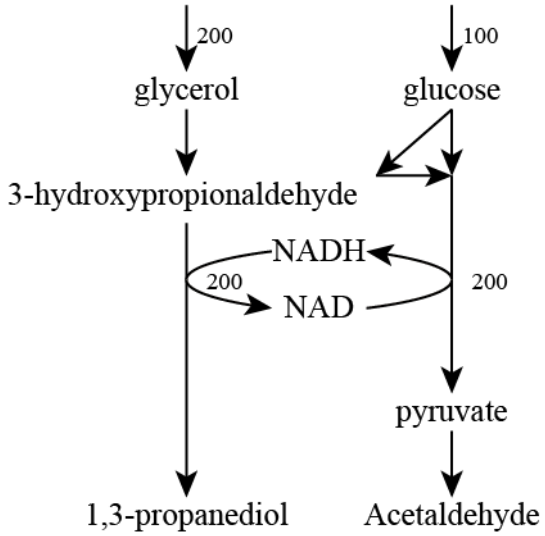

Fig. 4.11　グルコースおよびグリセロールから 1,3-プロパンジオールが理論最大収率で生産される場合のフラックス分布　図のフラックスはグルコース取り込みを 100 として正規化しており，フラックスがゼロでない経路のみを表示した.

4.4　考察

本章ではまず第 3 章で行った乳酸生産と同じく，嫌気条件においてエタノール-グリセロール生産抑制株を用いて生産される可能性のある物質がその生産状態においてどのような代謝フラックスを取る可能性があるかを，生産状態のフラックス分布を詳細に見ることにより検証した．エタノール-グリセロール生産抑制株を用いて生産される可能性のある物質としては，乳酸生産の競合物質として第 3 章で排除した物質群 (Table 3.3) に着目した．これらの物質は，実際の酵母株ではほとんど生産されることはないが，外来遺伝子の導入や，野生型では発現量が低い生合成経路の強化などの代謝改変が行われば生産される可能性がある．

そこで本章ではまず，Table3.3 に含まれる物質のうち，乳酸とほぼ同じ役割を単独で代替できる物質 (Group A) についてみた．Group A に含まれる 4 つの物質の生合成反応は，全て嫌気条件においてエタノールおよびグリセロール生産経路が担っていた役割を代替できるものとして見出されたため，高い収率で生産される代謝状態をもつことが可能であることが期待された．そこで実際に PhPP を描いてこれらの物質の高収率な生産状態があることを確認し，生産状態におけるフラックス分布を解析した．その結果これら 4 つの物質のうち，アラニン，バリン，コハク酸は取り込まれた全ての炭素がピルビン酸の生産まで流れるという共通の特徴を持っていた．これは乳酸においても同様である．これらの物質の違いはピルビン酸以降の経路において，解糖系で生産された NADH の再酸化を行なう方法である．これらの物質を生産させる戦略としては，乳酸の場合と同じように必要な代謝反応を増強するように遺伝子の導入を行い，嫌気条件で培養するという方法が考えられる．特にアラニンは，出芽酵母が保持しないアラニンデヒドロゲナーゼを導入することで第 3 章における乳酸生産プロセス構築のケースに非常に近い状況になることが予測された．

一方，ソルビトールの生産状態は上述の 3 つの物質とは異なり，嫌気条件においてとりうるフラックスの範囲に幅が存在した．ソルビトールのフラックスが最小になる場合には解糖系で生産される NADH とソルビトールで生産される $NADP^+$がグルタミン-グルタミン酸周りの経路を介してつながっているというシミュレーション結果が得られた．一方，ソルビトール生産のフラックスが最大となる場合のフラックス分布は，解糖系に流れるフラックスが少なく，ソルビトール生産で生じる $NADP^+$の還元を，ペントースリン酸経路で行う代謝状態をとるというシミュレーション結果が得られた．出芽酵母でこのような大幅な細胞内代謝の変化が起こりうるかについては不明である．

次に，エタノール-グリセロール生産抑制株を用いた乳酸生産の際に見出された物質のうち，その物質の生産反応を利用し解糖系で生産される NADH の一部を酸化することができる物質群 (Group B) について考察を行った．これらの物質に共通する性質として，ある特定の酸素比消費速度において，当該物質を生産するような唯一の代謝状態を取り得るという共通性が見られた．

さらに本研究では外来の反応経路を利用した有用物質生産の例として 1,3-プロパンジオール生産状態の設計を試みた．その結果 1,3-プロパンジオールはグルコースを単一炭素源としては生産されないが，グリセロールとグルコースの複合炭素源を用いることで嫌気条件において高収率に生産される可能性があるという結果を得た．1,3-プロパンジオールを例として行ったように，外来の経路を導入して物質生産する際の計画立案についてもゲノムスケール代謝モデルは利用可能である．1,3-プロパンジオールの生産に関わる反応は数が少なく，そのシミュレーション結果も単純であったが，追加する代謝反応の数に制限はなく，多くの反応を導入して物質生産の設計を行う際にも，PhPP を用いて見通しの良い代謝経路の検討を行うことが可能であると考えられる．

ゲノムスケール代謝モデルを用いた解析には以下のような利点があると考えられる．1 つ目は，細胞の代謝改変の範囲を規定することが可能であることである．ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションを行うことにより，取り込んだ炭素源から特定の代謝物質のフラックスが理論上とりうる上限および下限を機械的に求めることが可能である．これにより物質生産のフラックスをどこまで人為的に改変することが可能であるかを見極めることができる．2 つ目は，細胞を用いた生産が可能な代謝物を抽出できることである．酵母の iND750 モデルは，排出可能な物質として 117 の代謝物質の排出経路を備えている．しかしながら，今回の解析により，嫌気条件においてエタノール-グリセロール生産抑制株において生産することができると予測されたものは，アラニン，バリン，ソルビトール，コハク酸の 4 つの物質だけである．PhPP を用いた解析により，細胞を用いた生産の可能性が高い物質を大きく絞ることができる．3 つ目は，細胞内の代謝フラックス分布を定量的に予測できることである．PhPP に描かれたすべての領域において，細胞内に存在するすべての反応がどのようなフラックス分布となっているかを定量的に示すことができる．この情報から，目的とする物質生産のメカニズムを理解することができ，とりうる代謝改変戦略を立案することができる．

一方で問題点としては，ソルビトールの生産フラックスのシミュレーションで見られたように，PhPP によって理論上実現しうる高収率に生産する代謝状態が判明しても，その実験的な実現が困難と思われる場合もある．また，本章で検討した物質と乳酸の違いとして乳酸は重要な経路を 1 つ追加するだけで生産可能であったのに対して，今回候補として提案した物質は，外来の経路を導入することを提案したアラニンを除き多段階の経路の増強が必要であることが挙げられる．ここで，各物質の高生産株を構築するために，モデルから示された増強すべき経路に含まれるすべての反応の改善が必要であるか，特定の場所がボトルネックとなっているかについてはゲノムスケール代謝モデルからは推定できないが，少なくとも今後複数の代謝経路の発現増強手段の確保が重要となると考えられる．その方法としては近年開発されている枯草菌を用いた複数の遺伝子を同時導入するシステム (Nishizaki et al 2007) ．また，ゲノム全合成による細胞作成技術 (Gibson et al 2008) などが候補として期待される．これらの技術を用いることで今後数個から十数個の遺伝子の過剰発

現が可能になれば，本研究で提案したような代謝設計は十分に実現可能となると考えられる．

4.5　結言

本章では Phenotype phase plane (PhPP) を用いた解析について考察した．特にエタノール-グリセロール生産経路抑制株を用いることで，嫌気条件において着目物質のみが生産されるケースに着目し，アラニン，バリン，ソルビトール，コハク酸，1,3-プロパンジオールの生産が第 3 章で乳酸に対して試みたのと同じ戦略で生産できる可能性を示した．特にアラニンについて，アラニンデヒドロゲナーゼの導入によりアラニンが生産される状況は第 3 章で行った乳酸生産と非常に類似しており，ほぼ同様の戦略により生産プロセスが構築可能であることが期待される．一方，本研究で行ったような代謝を実現する場合の課題として，バリン，ソルビトール，およびコハク酸を生産するに当たっては，生産までに多段階の反応を増強する必要があった．従ってこれらの物質生産を実現するためには，効率の良い発現増強システムを利用する必要性が示唆された．

本章で示された PhPP を用いるメリットとしては，細胞内代謝反応が取りうる範囲の推定や，生産の可能性がある物質の抽出を機械的に行うことができ，かつ着目する物質が生産される状態のフラックス分布を個別に示し，その生産量の最大値について定量的な示唆を与えることを可能とする点である．

第 5 章　結論

本研究では，出芽酵母を用いた物質生産のための代謝設計法の開発に向け，エタノール-グリセロール生産抑制酵母株の構築 (第 2 章)，構築した株を用いた高収率乳酸生産プロセスの実現 (第 3 章)，乳酸生産プロセスに用いた代謝設計法の他の有用物質への応用 (第 4 章) について研究を行った．

第 2 章では，野生型の出芽酵母が主生産物とするエタノールおよびグリセロールの生産を抑制した組換え株の構築と，その性質について研究を行った．野生型の出芽酵母においてエタノールおよびグリセロール生産経路は大きなフラックスを持っているため，目的物質を生産する際の障害となり得る．先行研究において，出芽酵母が主生産物として生産するエタノールは *ADH1* の破壊により抑制されることが知られていたが (Cordier et al 2007; Drewke et al 1990)，本研究により *ADH1* の破壊によるエタノール生産の抑制は酸素供給を制限して培養することにより緩和されることを明らかとし，さらにその原因が ADH アイソザイムの発現量変化であることが確認された．次にこの結果を受け，出芽酵母の持つ NADH 依存性アルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である *ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, SFA1* を全て破壊した株を構築し，この株が長期間に渡り安定的にエタノールを生産しない特性を維持することを確認した．さらに，得られたエタノール生産抑制株に対して，グリセロール生産に関わる *GPD1*，*GPD2* の破壊を行いエタノールとグリセロールの生産経路を両方抑制した株を新規に構築した．構築した株を培養した結果，酵母野生型株と比較してエタノールおよびグリセロールの生産が大幅に抑制されていることが明らかとなった．

第 3 章では，第 2 章で構築したエタノール-グリセロール生産抑制株に乳酸生産経路を導入した組換え株を用いた乳酸生産に関して調べた．構築した乳酸生産株を，坂口フラスコを用いて振とう培養した結果, 理論上最大の乳酸収率は 2 (mol-lactate/mol-glucose) であるのに対して，実際の乳酸生産収率は 0.41 (mol-lactate/mol-glucose) 程度と低い値を示した．次にゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションによる，着目した代謝フラックスとバイオマス生産の関係性を可視化する Phenotype phase plane (PhPP) を用いた解析より，エタノールとグリセロールの生産経路を共にゼロとし，酸素消費もない場合には，実現し得る代謝状態は取り込んだグルコースを全て乳酸に変換する代謝状態のみであるという予測が得られた．そこで，この予測に基づき，構築した乳酸生産株を，窒素通気により嫌気条件にしたジャーファーメンターで培養した．その結果，取り込んだグルコースに由来する炭素をほぼ 100%乳酸に変換する生産プロセスを実現することに成功した．ここで得られた乳酸生産収率はこれまで報告されたものの中で最高の値であり，理論最大収率 2 (mol-lactate/mol-glucose) と一致した．

第 4 章では，第 3 章において用いた PhPP 解析の結果についてさらに深く考察し，乳酸生産と同じく，嫌気条件において，生産することによりエタノールやグリセロールの生合成

反応が担っていた NADH の酸化を代替することができる物質として見出されたアラニン，バリン，ソルビトール，コハク酸の生産におけるフラックス分布を確認した．また，酵母が生産しない 1,3-プロパンジオールの生産について，ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションを行い，エタノールとグリセロールを生産しない株においてグルコース単独での生産は不可能であるが，グルコースとグリセロールの複合炭素源により収率良く 1,3-プロパンジオールが生産される可能性があるという予測を得た．

本研究で得られた成果は，出芽酵母の NADH 生産手段であるエタノールとグリセロールの両生産経路をアイソザイムの多重破壊により抑制した酵母組換え株 (S245) の構築と，Phenotype phase plane (PhPP) を用いた育種法の乳酸生産における実践例である．先行研究において，エタノールとグリセロールは，それぞれの経路単独の抑制株の構築例がある．すなわち，それらが共に出芽酵母を用いた物質生産の際に副産物となるという認識はあったものの，これまでに両経路を共に抑制した株の構築は行われていなかった．本研究で構築した株は，酵母野生型株の主要生産物であるエタノールとグリセロールを生産しない上，解糖系で生産される NADH を再酸化する方法を失っているため，NADH 酸化を伴う反応を導入することでその反応が強く駆動されることが期待される．しかし，細胞内における $NADH/NAD^+$のバランスを満たす代謝の流れを，多くの代謝反応を把握しつつ予測するのは困難であった．この点を解決するために本研究では，ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションを利用した．PhPP は着目している物質生産フラックスのとりうる最大値および最小値を，酸素比消費速度を設定するなどした様々な条件で描画することが可能であり，かつ個別の条件の代謝フラックスを仔細に見ることもできるため，効果的な培養条件の検討を行うことが可能である．本研究では，このような PhPP を用いた解析と構築したエタノール-グリセロール生産抑制株を利用して高収率乳酸生産プロセスを構築した．

本研究では当初，物質生産の際の副産物を減少させるという目的でエタノール生産経路，次いでグリセロール生産経路の抑制を行った．また，細胞内で起きている代謝反応の網羅的理解を物質生産に活かすという動機を持ってゲノムスケール代謝モデルを利用することとした．そして，結果的にこれらから得られた知見は NADH の役割に収束し，乳酸を高収率で生産するプロセスの開発につながった．

一方，微生物を用いた物質生産を改善する手法として，本研究で着目してきた基質の目的物質への変換効率の改善以外に序論において，単位時間，細胞あたりの生産速度の改善と，生産性を低下させる各種ストレスに対する耐性の付与を挙げた．ゲノムスケールモデルによるシミュレーションにおいては，化学量論のみを基盤としているので基質から各代謝物への生産収率は議論できるが，速度論に関する予測は不可能でありそれがこの方法の限界である．

これらについて，本研究で構築した乳酸生産株にはその大きな欠点としてグルコースの消費速度の遅さが残された．この原因としてはグルコース取り込みチャンネルの機能や，

細胞内に存在する代謝経路のボトルネックが関与している可能性が考えられる．ゲノムスケール代謝モデルは定常状態を仮定しているため細胞内に存在する代謝物質の濃度変化が反応速度に与える影響や，個別のとり込み反応の活性については考慮できない．しかし，代謝の流れは細胞内に存在する代謝物質の濃度やそれに依存する物理化学的法則あるいは制御メカニズムにも大きく影響を受けると考えられる．細胞育種で用いられる別のアプローチとして細胞内に存在する代謝物質の濃度 (メタボローム) に着目した育種が最近注目されている (Hasunuma et al., 2011)．メタボローム解析を利用して細胞内に蓄積している物質を明らかにし，そこから反応進行の律速となっている物質を特定する方法で，物質生産に必要な経路を整備する際に，その経路に含まれる反応の中で全体の流れに大きな影響を与えうるものを抽出することも可能であると期待される．

また，本研究では構築した株のストレス耐性に関して深く立ち入った考察を行うことはしなかった．しかしながら，実際の物質生産株の運用を行う際に基質濃度や生産物に対して高い耐性を持った株を用いる方が好ましいことは論を待たない．微生物にストレス耐性を付加する試みとしては，微生物が環境に対する適応能力を持つことを利用し，長期間に渡りストレスをかけた状態で培養を行うことでストレス耐性を持つ細胞株を取得する方法がある．また，近年ではマイクロアレイや全ゲノム解析により，細胞の適応メカニズムを解明し，細胞に対してストレス耐性を効果的に付加する試みもなされている．

このように，メタボローム解析や進化工学など細胞の生産速度やストレス耐性を付加する試みは，本研究で行ったゲノムスケール代謝モデルを用いた解析と組み合わせることで育種に対して，有効な情報を与えることが今後期待される．

以上の研究結果をふまえ，微生物を用いた有用物質生産に向けた代謝設計の戦略について総括する．本研究の目的は，微生物を用いた有用物質生産を可能とするための代謝設計法を開発することである．本研究で提案する代謝設計法は，「ゲノムスケール代謝モデルを用いて基質の大部分を目的物質に変換する状態しかとりえない条件を探索し，実際の細胞に対してその条件を実装することにより高収率物質生産状態を実現する方法」と表現できる．

本研究の第 2 章ではグリセロールとエタノールという出芽酵母にとって重要な代謝経路を抑制し，ゲノムスケール代謝モデルにおいてそれらの代謝経路をゼロにした状態と比較しうる遺伝子破壊株の構築を行った．そして，第 3 章において第 2 章で構築した株および PhPP を用いた代謝設計とその実用例を模索し，第 4 章でその応用可能性を論じた．

本研究では，PhPP を描くことにより目的物質の比生産速度と，酸素の比消費速度を様々に変化させた場合に代謝のとりうる状態を可視化し，物質生産の検討すなわち代謝設計を行った．ここで行った代謝設計の手法は今後より広い範囲に適応できる可能性がある．

PhPP の利用には少なくとも 2 つのメリットがある．1 つ目は，PhPP を用いることで着目する物質の比生産速度がとりうる範囲を決定できることである．本研究では横軸に目的物

質の比生産速度をとった PhPP を用いることにより，出芽酵母が取り込んだ基質を目的物質に変換する際にとりうる比生産速度の範囲を求めた．このように，PhPP を用いることにより物質生産がどの程度の範囲で可能であるかの一時スクリーニングを行うことができる．すなわち，PhPP を描いた際，横軸に生産範囲を持たない物質は，少なくともシミュレーションに利用したゲノムスケール代謝モデルに組み込まれた反応を利用して生産することができない．したがって，そのような物質の生産を検討する場合はゲノムスケール代謝モデルに新たに経路を追加することにより，モデルの規定する解空間の範囲を拡張するか，1,3 プロパンジオールの例で示したように新たな基質を追加することで生産できる可能性を検討する必要がある．

2 つ目は，PhPP を用いることで目的物質のみを生産するような状態を探索することが可能であるということである．いま，目的物質の生産フラックスがある範囲を持った場合，適切な代謝経路のフラックスを縦軸にとることで，Fig. 5.1A のように縦軸に設定した代謝経路を流れるフラックスが小さい場合に大きな目的物質生産フラックスを持つ場合を考える．このような形になった場合，PhPP 上で横軸に置いた目的物質の生産が低い範囲をうまく絞り込むことができるような代謝経路の削除を探索することで，とりうる代謝状態が目的物質を生産する狭い範囲に限定されるような状況が見つかる場合がある．本研究では，縦軸に酸素比消費速度をとり，Fig. 5.1B のような形状に代謝がとりうる範囲を絞り込む代謝経路を求めた．すなわち，酸素取り込みの制限と，目的物質を生産しない生産領域で生産されている物質の排出フラックスをゼロにしていくという戦略で，有用物質が効率的に生産される代謝状態を予測することに成功した．そしてこの予測結果の妥当性は実験により示された．

本研究では，実際の培養実験でコントロールしやすいため，酸素比消費速度を縦軸としたが，同様の操作は酸素消費速度以外に他の代謝反応のフラックスをとって検討することも可能である．今後，PhPP の形に影響を与え，かつ制御しやすい縦軸の選択法や，代謝経路の削除による解空間の制限法についての一般的な手法を明らかとし，これらをブラッシュアップしてゆくことで PhPP を用いた代謝設計法の実用性は，より高まると期待される．これを探索する方法としては，PhPP の形がどのようにして決まるのかを数学上の問題として解き，論理的に PhPP の形を決める方法，あるいは自動的に大量の PhPP を描き，画像解析を行なって希望にあった特徴を持つものを抽出してくるプログラムを使うといった方法が考えられる．

大量のデータを組合せた大規模モデルであるゲノムスケール代謝モデルを利用する上で，出力される情報をいかに見通しよく処理するかは，代謝設計ひいては育種にかかる時間を大きく左右する重要な要素である．ゲノムスケール代謝モデルが扱う多次元の解空間から細胞の活動に重要な影響を与えるベクトルに着目し可視化する方法は多く提案されている (Price et al., 2004)．今後，それらの代表的な手法である PhPP 解析などを，理論のままにするのではなく，実際の遺伝子操作，培養を伴う育種に応用してゆくことで今後の育種のス

ピードは微生物を用いた物質生産の需要の増加に答えていけると期待される．また，本論文では扱いきれなかった物質生産の速度向上や律速点抽出についてもメタボロミクス，進化工学などの様々な方法を駆使して改善を図ることが期待される．

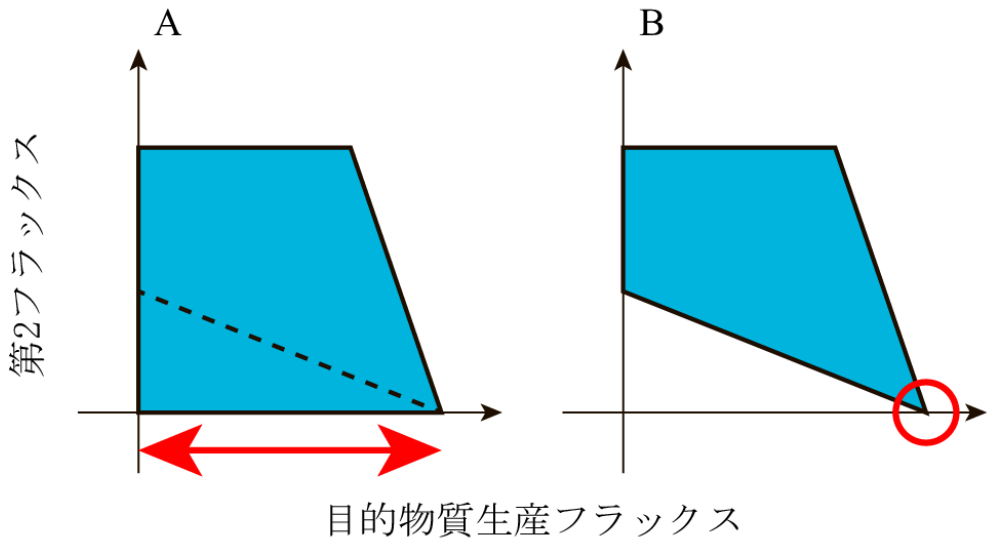

Fig. 5.1　目的物質の生産フラックスを横軸に，特定のフラックスを縦軸に設定し，描いた代表的 Phenotype phase plane (PhPP) の形状．　A のような形になる場合には目的物質の生産量は定まらない，一方 A に対して適切な代謝経路の抑制により取りうる範囲を B のように PhPP を変形させることが出来れば，目的物質の生産状態のみが第 2 フラックスを制限した環境下での唯一の解となる．この場合適切な代謝状態を実現する環境を整えることで目的物質生産が期待できる．

参考文献

Adachi, E. (1998). Modification of Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the Expression of Lactate Dehydrogenase and Deletion of Pyruvate Decarboxylase Genes for the Lactic Acid Fermentation at Low pH Value. Journal of Fermentation and Bioengineering **86**, 284–289.

Antoni, D., Zverlov, V.V., and Schwarz, W.H. (2007). Biofuels from microbes. Applied Microbiology and Biotechnology **77**, 23–35.

Asadollahi, M. a, Maury, J., Patil, K.R., Schalk, M., Clark, A., and Nielsen, J. (2009). Enhancing sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* through in silico driven metabolic engineering. Metabolic Engineering **11**, 328–334.

Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., and Banerjee, U.C. (2002). Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. Critical Reviews in Biotechnology **22**, 245–279.

Battat, E., Peleg, Y., Bercovitz, a, Rokem, J.S., and Goldberg, I. (1991). Optimization of L-malic acid production by Aspergillus flavus in a stirred fermentor. Biotechnology and Bioengineering **37**, 1108–1116.

Beuermann, T., Egly, D., Geoerg, D., Klug, K.I., Storhas, W., and Methner, F.-J. (2012). On-line carbon balance of yeast fermentations using miniaturized optical sensors. Journal of Bioscience and Bioengineering **113**, 399–405.

Blombach, B., Schreiner, M.E., Bartek, T., Oldiges, M., and Eikmanns, B.J. (2008). Corynebacterium glutamicum tailored for high-yield L-valine production. Applied Microbiology and Biotechnology **79**, 471–479.

Brachmann, C.B., Davies, a, Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. Yeast (Chichester, England) **14**, 115–132.

Bro, C., Regenberg, B., Förster, J., and Nielsen, J. (2006). In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. Metabolic Engineering **8**, 102–111.

Cao, N., Du, J., Gong, C., and Tsao, G. (1996). Simultaneous Production and Recovery of Fumaric Acid from Immobilized Rhizopus oryzae with a Rotary Biofilm Contactor and an Adsorption Column. Applied and Environmental Microbiology **62**, 2926–2931.

Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. Trends in Biotechnology **26**, 126–131.

Cordier, H., Mendes, F., Vasconcelos, I., and François, J.M. (2007). A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production. Metabolic Engineering **9**, 364–378.

Demain, a L. (2000). Microbial biotechnology. Trends in Biotechnology **18**, 26–31.

Dequin, S., and Barre, P. (1994). Mixed Lactic Acid–Alcoholic Fermentation by Saccharomyes cerevisiae Expressing the Lactobacillus casei L (+)–LDH. Nature Biotechnology **12**, 173–177.

Dorsey, M., Peterson, C., Bray, K., and Paquin, C.E. (1992). Spontaneous amplification of the ADH4 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics **132**, 943.

Duarte, N.C., Herrgård, M.J., and Palsson, B.Ø. (2004). Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. Genome Research **14**, 1298–1309.

Edwards, J.S., Ibarra, R.U., and Palsson, B.O. (2001). In silico predictions of Escherichia coli metabolic capabilities are consistent with experimental data. Nature Biotechnology **19**, 125–130.

Edwards, J.S., and Palsson, B.O. (1999). Systems properties of the Haemophilus influenzae Rd metabolic genotype. The Journal of Biological Chemistry **274**, 17410–17416.

Edwards, J.S., Ramakrishna, R., and Palsson, B.O. (2002). Characterizing the metabolic phenotype: a phenotype phase plane analysis. Biotechnology and Bioengineering **77**, 27–36.

Flikweert, M.T., de Swaaf, M., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (1999). Growth requirements of pyruvate-decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters **174**, 73–79.

Fong, S., Marciniak, J., and Palsson, B. (2003). Description and interpretation of adaptive evolution of Escherichia coli K-12 MG1655 by using a genome-scale in silico metabolic model. Journal of Bacteriology **185**, 6400–6408.

Förster, J., Famili, I., and Fu, P. (2003). Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. Genome Research **13**, 244–253.

Georgi, T., Rittmann, D., and Wendisch, V.F. (2005). Lysine and glutamate production by Corynebacterium glutamicum on glucose, fructose and sucrose: roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. Metabolic Engineering **7**, 291–301.

Gietz, R.D., and Woods, R. a (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. Methods in Enzymology **350**, 87–96.

González, E., Fernández, M.R., Larroy, C., Solà, L., Pericàs, M. a, Parés, X., and Biosca, J. a (2000). Characterization of a (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* YAL060W gene product. Disruption and induction of the gene. The Journal of Biological Chemistry **275**, 35876–35885.

Guadalupe Medina, V., Almering, M.J.H., van Maris, A.J. a, and Pronk, J.T. (2010). Elimination of glycerol production in anaerobic cultures of a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to use acetic acid as an electron acceptor. Applied and Environmental Microbiology **76**, 190–195.

Hasunuma, T., Sanda, T., Yamada, R., Yoshimura, K., Ishii, J., and Kondo, A. (2011). Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Cell Factories **10**, 2.

Hong, S.H., Kim, J.S., Lee, S.Y., In, Y.H., Choi, S.S., Rih, J.-K., Kim, C.H., Jeong, H., Hur, C.G., and Kim, J.J. (2004). The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium Mannheimia succiniciproducens. Nature Biotechnology **22**, 1275–1281.

Hwang, J.-H., Hwang, G.-H., and Cho, J.-Y. (2008). Effect of increased glutamate availability on L-ornithine production in Corynebacterium glutamicum. Journal of Microbiology and Biotechnology **18**, 704–710.

Hüser, A.T., Chassagnole, C., Lindley, N.D., Merkamm, M., Guyonvarch, A., Elisáková, V., Pátek, M., Kalinowski, J., Brune, I., Pühler, A., et al. (2005). Rational design of a Corynebacterium glutamicum pantothenate production strain and its characterization by metabolic flux analysis and genome-wide transcriptional profiling. Applied and Environmental Microbiology **71**, 3255–3268.

Ibarra, R.U., Edwards, J.S., and Palsson, B.O. (2002). Escherichia coli K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. Nature **420**, 20–23.

Ishida, N., Saitoh, S., Onishi, T., Tokuhiro, K., Nagamori, E., Kitamoto, K., and Takahashi, H. (2006a). The effect of pyruvate decarboxylase gene knockout in *Saccharomyces cerevisiae* on L-lactic acid production. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **70**, 1148–1153.

Ishida, N., Saitoh, S., Tokuhiro, K., Nagamori, E., Matsuyama, T., Kitamoto, K., and Takahashi, H. (2005). Efficient Production of L -Lactic Acid by Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a Genome-Integrated L -Lactate Dehydrogenase Gene. Society **71**, 1964–1970.

Ishida, N., Suzuki, T., Tokuhiro, K., Nagamori, E., Onishi, T., Saitoh, S., Kitamoto, K., and Takahashi, H. (2006b). D-lactic acid production by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering **101**, 172–177.

John, R.P., Nampoothiri, K.M., and Pandey, A. (2007). Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology **74**, 524–534.

Jojima, T., Fujii, M., Mori, E., Inui, M., and Yukawa, H. (2010). Engineering of sugar metabolism of Corynebacterium glutamicum for production of amino acid L-alanine under oxygen deprivation. Applied Microbiology and Biotechnology **87**, 159–165.

Jouhten, P., Rintala, E., Huuskonen, A., Tamminen, A., Toivari, M., Wiebe, M., Ruohonen, L., Penttilä, M., and Maaheimo, H. (2008). Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A. BMC Systems Biology **2**, 60.

Kondo, T., Tezuka, H., Ishii, J., Matsuda, F., Ogino, C., and Kondo, A. (2012). Genetic engineering to enhance the Ehrlich pathway and alter carbon flux for increased isobutanol production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biotechnology **159**, 32–37.

Kotaka, A., Bando, H., Kaya, M., Kato-Murai, M., Kuroda, K., Sahara, H., Hata, Y., Kondo, A., and Ueda, M. (2008). Direct ethanol production from barley beta-glucan by sake yeast displaying Aspergillus oryzae beta-glucosidase and endoglucanase. Journal of Bioscience and Bioengineering **105**, 622–627.

Kuyper, M., Winkler, A. a, van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (2004). Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. FEMS Yeast Research **4**, 655–664.

Ladero, V., Ramos, A., Wiersma, A., Goffin, P., Schanck, A., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., Smid, E.J., and Hols, P. (2007). High-level production of the low-calorie sugar sorbitol by Lactobacillus plantarum through metabolic engineering. Applied and Environmental Microbiology **73**, 1864–1872.

Larroy, C., Fernández, M.R., González, E., Parés, X., and Biosca, J.A. (2002a). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. Biochemical Journal **361**, 163.

Larroy, C., Parés, X., and Biosca, J. a (2002b). Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family. European Journal of Biochemistry **269**, 5738–5745.

Lee, K.H., Park, J.H., Kim, T.Y., Kim, H.U., and Lee, S.Y. (2007). Systems metabolic engineering of Escherichia coli for L-threonine production. Molecular Systems Biology **3**, 149.

Lee, S.Y., Kim, J.M., Song, H., Lee, J.W., Kim, T.Y., and Jang, Y.-S. (2008). From genome sequence to integrated bioprocess for succinic acid production by Mannheimia succiniciproducens. Applied Microbiology and Biotechnology **79**, 11–22.

Lin, Y., and Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Applied Microbiology and Biotechnology **69**, 627–642.

Lütke-Eversloh, T., and Stephanopoulos, G. (2007). L-tyrosine production by deregulated strains of Escherichia coli. Applied Microbiology and Biotechnology **75**, 103–110.

Ma, Z., Rao, Z., Xu, L., Liao, X., Fang, H., Zhuge, B., and Zhuge, J. (2010). Expression of dha operon required for 1,3-PD formation in Escherichia coli and *Saccharomyces cerevisiae*. Current Microbiology **60**, 191–198.

van Maris, A.J.A., Geertman, J.M.A., Vermeulen, A., Groothuizen, M.K., Winkler, A.A., Piper, M.D.W., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (2004a). Directed evolution of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*, yielding a C2-independent, glucose-tolerant, and pyruvate-hyperproducing yeast. Applied and Environmental Microbiology **70**, 159.

van Maris, A.J.A., Winkler, A.A., Porro, D., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (2004b). Homofermentative lactate production cannot sustain anaerobic growth of engineered *Saccharomyces*

cerevisiae: possible consequence of energy-dependent lactate export. Applied and Environmental Microbiology **70**, 2898.

Matsushika, A., Watanabe, S., Kodaki, T., Makino, K., and Sawayama, S. (2008). Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP(+)-dependent xylitol dehydrogenase, and xylulokinase. Journal of Bioscience and Bioengineering **105**, 296–299.

Mewes, H.W., Frishman, D., Güldener, U., Mannhaupt, G., Mayer, K., Mokrejs, M., Morgenstern, B., Münsterkötter, M., Rudd, S., and Weil, B. (2002). MIPS: a database for genomes and protein sequences. Nucleic Acids Research **30**, 31–34.

Nakamura, C.E., and Whited, G.M. (2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. Current Opinion in Biotechnology **14**, 454–459.

Ng, C.Y., Jung, M.-Y., Lee, J., and Oh, M.-K. (2012). Production of 2,3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae* by in silico aided metabolic engineering. Microbial Cell Factories **11**, 68.

Nielsen, D.R., Leonard, E., Yoon, S.-H., Tseng, H.-C., Yuan, C., and Prather, K.L.J. (2009). Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. Metabolic Engineering **11**, 262–273.

Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., and Kanehisa, M. (1999). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic Acids Research **27**, 29–34.

Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A. (2010). Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. Applied Microbiology and Biotechnology **85**, 413–423.

Okano, K., Zhang, Q., Shinkawa, S., Yoshida, S., Tanaka, T., Fukuda, H., and Kondo, A. (2009). Efficient production of optically pure D-lactic acid from raw corn starch by using a genetically modified L-lactate dehydrogenase gene-deficient and alpha-amylase-secreting Lactobacillus plantarum strain. Applied and Environmental Microbiology **75**, 462–467.

Okino, S., Suda, M., Fujikura, K., Inui, M., and Yukawa, H. (2008). Production of D-lactic acid by Corynebacterium glutamicum under oxygen deprivation. Applied Microbiology and Biotechnology **78**, 449–454.

Paquin, C.E., Dorsey, M., Crable, S., Sprinkel, K., Sondej, M., and Williamson, V.M. (1992). A spontaneous chromosomal amplification of the ADH2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics **130**, 263–271.

Park, J.H., Kim, T.Y., Lee, K.H., and Lee, S.Y. (2011). Fed-batch culture of Escherichia coli for L-valine production based on in silico flux response analysis. Biotechnology and Bioengineering **108**, 934–946.

Park, J.H., Lee, K.H., Kim, T.Y., and Lee, S.Y. (2007). Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**, 7797–7802.

Price, N.D., Reed, J.L., and Palsson, B.Ø. (2004). Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. Nature Reviews. Microbiology **2**, 886–897.

Raab, A.M., Gebhardt, G., Bolotina, N., Weuster-Botz, D., and Lang, C. (2010). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. Metabolic Engineering **12**, 518–525.

Rao, Z., Ma, Z., Shen, W., Fang, H., Zhuge, J., and Wang, X. (2008). Engineered *Saccharomyces cerevisiae* that produces 1,3-propanediol from D-glucose. Journal of Applied Microbiology **105**, 1768–1776.

Selvarasu, S., Wong, V.V.T., Karimi, I. a, and Lee, D.-Y. (2009). Elucidation of metabolism in hybridoma cells grown in fed-batch culture by genome-scale modeling. Biotechnology and Bioengineering **102**, 1494–1504.

Sendovski, M., Nir, N., and Fishman, A. (2010). Bioproduction of 2-phenylethanol in a biphasic ionic liquid aqueous system. Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**, 2260–2265.

Sheikh, K., Förster, J., and Nielsen, L.K. (2005). Modeling hybridoma cell metabolism using a generic genome-scale metabolic model of Mus musculus. Biotechnology Progress **21**, 112–121.

Shibuya, H., Irie, K., and Ninomiya-Tsuji, J. (1992). New human gene encoding a positive modulator of HIV Tat-mediated transactivation. Nature **357**, 700–702.

Skory, C.D. (2003). Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a Rhizopus oryzae lactate dehydrogenase gene. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **30**, 22–27.

de Smidt, O., du Preez, J.C., and Albertyn, J. (2008). The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. FEMS Yeast Research **8**, 967–978.

de Smidt, O., du Preez, J.C., and Albertyn, J. (2012). Molecular and physiological aspects of alcohol dehydrogenases in the ethanol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research **12**, 33–47.

Sohn, S.B., Kim, T.Y., Park, J.M., and Lee, S.Y. (2010). In silico genome-scale metabolic analysis of Pseudomonas putida KT2440 for polyhydroxyalkanoate synthesis, degradation of aromatics and anaerobic survival. Biotechnology Journal **5**, 739–750.

Takagi, H., Awano, N., Kobayashi, S., Noji, M., Saito, K., and Nakamori, S. (1999). Overproduction of L-cysteine and L-cystine by expression of genes for feedback inhibition-insensitive serine acetyltransferase from Arabidopsis thaliana in Escherichia coli. FEMS Microbiology Letters **179**, 453–459.

Tokuhiro, K., Ishida, N., Nagamori, E., Saitoh, S., Onishi, T., Kondo, A., and Takahashi, H. (2009). Double mutation of the PDC1 and ADH1 genes improves lactate production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing the bovine lactate dehydrogenase gene. Applied Microbiology and Biotechnology **82**, 883–890.

Torres, B.R., Aliakbarian, B., Torre, P., Perego, P., Domínguez, J.M., Zilli, M., and Converti, A. (2009). Vanillin bioproduction from alkaline hydrolyzate of corn cob by Escherichia coli JM109/pBB1. Enzyme and Microbial Technology **44**, 154–158.

Weng, S. (2003). Saccharomyces Genome Database (SGD) provides biochemical and structural information for budding yeast proteins. Nucleic Acids Research **31**, 216–218.

Wisselink, H.W., Cipollina, C., Oud, B., Crimi, B., Heijnen, J.J., Pronk, J.T., and van Maris, A.J. a (2010). Metabolome, transcriptome and metabolic flux analysis of arabinose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolic Engineering **12**, 537–551.

Wisselink, H.W., Moers, A.P.H.A., Mars, A.E., Hoefnagel, M.H.N., de Vos, W.M., and Hugenholtz, J. (2005). Overproduction of heterologous mannitol 1-phosphatase: a key factor for engineering

mannitol production by Lactococcus lactis. Applied and Environmental Microbiology **71**, 1507–1514.

Xu, G., Liu, L., and Chen, J. (2012). Reconstruction of cytosolic fumaric acid biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Cell Factories **11**, 24.

Yang, J., Wang, S., Lorrain, M.-J., Rho, D., Abokitse, K., and Lau, P.C.K. (2009). Bioproduction of lauryl lactone and 4-vinyl guaiacol as value-added chemicals in two-phase biotransformation systems. Applied Microbiology and Biotechnology **84**, 867–876.

Yin, L., Hu, X., Xu, D., Ning, J., Chen, J., and Wang, X. (2012). Co-expression of feedback-resistant threonine dehydratase and acetohydroxy acid synthase increase L-isoleucine production in Corynebacterium glutamicum. Metabolic Engineering **14**, 542–550.

Zahiri, H.S., Yoon, S.H., Keasling, J.D., Lee, S.H., Won Kim, S., Yoon, S.C., and Shin, Y.C. (2006). Coenzyme Q10 production in recombinant Escherichia coli strains engineered with a heterologous decaprenyl diphosphate synthase gene and foreign mevalonate pathway. Metabolic Engineering **8**, 406–416.

Zelle, R.M., de Hulster, E., van Winden, W. a, de Waard, P., Dijkema, C., Winkler, A. a, Geertman, J.-M. a, van Dijken, J.P., Pronk, J.T., and van Maris, A.J. a (2008). Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export. Applied and Environmental Microbiology **74**, 2766–2777.

Zhou, H., Liao, X., Wang, T., Du, G., and Chen, J. (2010). Enhanced l-phenylalanine biosynthesis by co-expression of pheA(fbr) and aroF(wt). Bioresource Technology **101**, 4151–4156.

謝辞

本研究を遂行するにあたり，大阪大学工学部応用自然科学科 4 年生から大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻の博士前期課程と博士後期課程の 6 年間，研究の場を与えて下さり，始終暖かくご指導，ご助言をいただきました大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻代謝情報工学講座，清水浩教授に心より御礼申し上げます．博士論文審査委員として，有益なご指導，ご助言をいただきました大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻の松田秀雄教授，若宮直紀教授，四方哲也教授，前田太郎教授，並びに理化学研究所生命システム研究センター大阪大学招へい教授古澤力先生に心より感謝申し挙げます．アドバイザリ委員として有益なご指導をいただきました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物工学コースゲノム機能工学領域の杉山峰崇准教授に心より感謝申し上げます．短期間ではありましたが，研究報告などで的確なご意見を頂いた代謝情報工学講座の松田史生准教授に心より感謝申し上げます．実験手法から研究生活，特に乳酸生産株の論文作成，博士論文作成において格別のご指導をいただきました代謝情報工学講座の平沢敬助教に心より感謝申し上げます．解析方法や書類作成において大変お世話になった奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科システム情報学領域小野直亮助教に心より感謝申し上げます．以前は先輩として，現在は指導者として親身なご指導を頂きました吉川勝徳特任助教に心より感謝申し上げます．普段の生活や学会時に暖かくご指導いただいた戸谷吉博特任助教に心より感謝申し上げます．様々な事務手続きにおいて親身に対応していただいた事務補佐の中野久美子様，菊池裕美様に心より感謝申し上げます．研究生活において様々な面で支えてくださった研究室後輩の皆様に心より感謝申し上げます．

最後に，長年にわたる大学生活を精神的，経済的に支えて下さった両親に心より感謝申し上げます．

付録　本論文の関連文献と本章の対応

第 **1** 章：序論

第 **2** 章：遺伝子破壊によるにエタノール・グリセロール生産抑制酵母株の構築

Ida, Y., Furusawa, C., Hirasawa, T., and Shimizu, H. (2012). Stable disruption of ethanol production by deletion of the genes encoding alcohol dehydrogenase isozymes in *Saccharomyces cerevisiae.* Journal of Bioscience and Bioengineering **113**, 192–195.

第 **3** 章：エタノール・グリセロール生産抑制酵母を宿主とした高収率乳酸生産のための代謝設計とその評価

Ida, Y., Hirasawa, T., Furusawa, C., Shimizu, H. “A computer-aided design of lactate production process using *Saccharomyces cerevisiae*” The 22nd International Conference on Genome Informatics (GIW2011), Busan, Korea, Dec. 5-7, 2011

Ida, Y., Hirasawa, T., Furusawa, C., Shimizu, H. “A computer-aided design of lactate production process using *Saccharomyces cerevisiae*” The 22nd International Conference on Genome Informatics (GIW2011), Busan, Korea, Dec. 5-7, 2011

第 **4** 章：ゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションによる有用物質の生産可能性についての解析

第 **5** 章：結論

関連発表論文

Yoshikawa, K., Tanaka, T., Ida, Y., Furusawa, C., Hirasawa, T., and Shimizu, H. (2011). Comprehensive phenotypic analysis of single-gene deletion and overexpression strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **28**, 349–361.

国内会議

[1] 井田祥弘, 平沢敬, 古澤力, 清水浩 “NADH 再酸化経路に着目した有用物質生産酵母の構築” 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, Dec. 13-16 2011.

[2] 井田祥弘, 平沢敬, 古澤力, 清水浩 “出芽酵母による有用物質生産に向けたアルコール生産経路破壊株の構築” 第 33 回分子生物学会年会(BMB2010), 神戸, Dec. 7-10 2010.

[3] 井田祥弘, 古澤力, Sunisa Chatsurachai, 新福洋平, 平沢敬, 清水浩 “ゲノムスケール代謝反応モデルを用いた酵母の代謝解析” 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, Dec. 9-12 2008.