



Title	Genome-scale metabolic design for improved target production of <i>Escherichia coli</i> based on flux balance analysis
Author(s)	徳山, 健斗
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69726
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名（徳山 健斗）	
論文題名	Genome-scale metabolic design for improved target production of <i>Escherichia coli</i> based on flux balance analysis (ブラックスバランス解析に基づく大腸菌の物質生産の改善に向けたゲノムスケールの代謝設計に関する研究)
論文内容の要旨	

微生物によるものづくりを達成するために、目的物質の生産性の高い有用発酵微生物を育種することが求められる。近年では、計算機上で細胞内の代謝状態を予測するシミュレーション法が開発され、その予測に基づく育種が行われてきた。細胞内の代謝反応を網羅的に記述したゲノムスケール代謝モデルに対し、flux balance analysis (FBA) を用いる事で、代謝系全体の物質収支を考慮した上で増殖運動型生産に有効な代謝を設計できる。FBAによる代謝設計により様々な育種の成功例が報告されてきたが、予測値に比べると実際の生産収率はいずれも低い。この要因として、現実の細胞の代謝反応は物質収支だけでなく、基質量や酵素量、酵素の速度論的特性による制約を受けるため、一部が律速反応となり、FBAで予測した代謝状態を実現できない事が一因として考えられる。本研究では、バイオプラスチックの原料となる3-ヒドロキシプロピオン酸 (3HP) やコハク酸の大腸菌による生産プロセスを例として、FBAによる代謝設計に基づいた律速機構の解明と律速解消による育種を試みた。

本学位論文は以下の第1章から第5章により構成される。第1章では、研究の背景および目的を述べる。第2章では、代謝反応の制約をブラックスの上限値としてFBAの制約条件に追加する事で、目的物質生産に対し律速となりうる代謝反応を予測する手法を開発した。本法を3HPおよびコハク酸生産へ適用し、いずれも律速反応候補を1つ以上予測する事に成功した。第3章では、FBAによる代謝設計により構築した3HP生産大腸菌を実験評価する事で律速機構の解明と育種を行った。3HP生産大腸菌では、副産物生産に関わる $yqhd$ 遺伝子の発現が誘導され、予測された律速反応の基質量が不足する事が律速機構の一因として示唆された。実際に、 $yqhd$ 遺伝子を追加で破壊することで基質量不足を解消させ、生産収率の向上に成功した。第4章ではFBAによる代謝設計と実験室進化により育種したコハク酸高生産大腸菌を実験評価する事で、律速反応として予測されたホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (Ppc) が、アスパラギン酸により阻害を受ける事が主な律速機構である事を明らかにした。さらに、実験室進化より獲得したPpc変異体は、アスパラギン酸非感受型の形質を示し、本菌株において律速を解消させコハク酸生産を向上した事を明らかにした。第5章では、本研究で得られた知見をまとめ、有用発酵微生物の育種に関して展望を述べた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (徳山 健斗)		
論文審査担当者	(職)	氏名
	主査 教授	清水 浩
	副査 教授	前田 太郎
	副査 教授	松田 秀雄
	副査 教授	松田 史生
	副査 教授	若宮 直紀

論文審査の結果の要旨

微生物の代謝をデザインすることは物質生産用の微生物創製にとって重要である。本論文では、バイオプラスチックの原料となる3-ヒドロキシプロピオン酸(3HP)やコハク酸の大腸菌による生産プロセスを例として、フラックスバランス解析法(FBA)による代謝デザインと律速機構の解明、およびその解消による優良微生物株育種を行っている。

本学位論文は以下の第1章から第5章により構成される。

第1章では、研究背景および本研究の目的および意義について述べている。

第2章では、代謝反応フラックスの上限値を設定しFBAの制約条件に追加することで、目的物質生産に対し律速となる可能性のある代謝反応を予測する手法を開発している。本法を用いることで、経験的に過去に見出されていた代謝律速点を効率よく探索ができることを示している。さらに、本論文で取り扱った3HPおよびコハク酸生産へ適用し、いずれも律速反応候補を予測することに成功している。

第3章では、FBAに基づく代謝設計により構築した3HP生産大腸菌を実験評価し、律速機構の解明と育種を行っている。3HP生産大腸菌では、副産物生産に関わる $yqhD$ 遺伝子の発現が誘導され、予測された律速反応の基質量が不足することが律速機構の一因として示唆されたことから実際に、 $yqhD$ 遺伝子を破壊することで基質量不足を解消させ、生産収率の向上に成功している。

第4章では、FBAに基づく代謝設計と実験室進化により育種したコハク酸高生産大腸菌を実験評価することで、律速反応として予測されたホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(Ppc)が、アスパラギン酸により阻害を受けることが主な律速機構であることを明らかにしている。さらに、実験室進化より獲得したPpc変異体は、アスパラギン酸非感受型の形質を示すことを明らかにし、本菌株で律速を解消し、コハク酸生産を向上させることに成功している。

第5章では、本研究で得られた知見をまとめ、有用発酵微生物の育種に関して展望を述べている。

以上のように、FBAを基盤とした代謝律速点の解明に関する新しい手法を提示し、その有用性を実際の菌株創製において実証しており、工学的、情報科学的に価値ある成果が得られている。よって、本論文は博士(情報科学)の学位論文として価値のあるものと認める。