The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Study on molecular breeding of yeast strain for bio-production based on flux balance analysis
Author(s)	森田, 啓介
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72600
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式3

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　森田　啓介　　）	
論文題名	Study on molecular breeding of yeast strain for bio-production based on flux balance analysis (フラックスバランス解析に基づく有用物質生産酵母の育種に関する研究)

論文内容の要旨

近年、有用物質の高生産を目指し、計算機支援型の微生物株の育種が盛んに行われている。フラックスバランス解析（FBA）は微生物細胞内の代謝状態を効率的かつ網羅的に予測可能な手法として、物質生産に適した代謝の設計に活用されてきた。工業的に優れた物質生産宿主である出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）は、バイオエタノールをはじめいくつかの化学物質の実生産に用いられている。しかしながら、FBAに基づく酵母株の育種はしばしばシミュレーション値と実験値が異なる結果となり、改善が求められている。本研究は計算機支援型の物質生産酵母の育種法の改善を目指して、FBA代謝シミュレーションに基づく物質生産株の育種を行い、現行の酵母FBAモデルの予測力と株の育種法を調査した。株の育種では代謝工学の設計-構築-試験-学習サイクルの理念に基づいて改変を行い、FBAシミュレーションで無視される要因を補完し、結果の相違点から問題の原因となる要因を考察した。さらに、その結果を元に改良したFBA代謝モデルを構築し、酵母に適した物質生産ターゲットの選定と、育種による検証を試みた。

学位論文は以下の4章で構成される。第1章では研究の背景および目的を述べる。第2章では、イソブタノールをターゲットとしてFBAに基づく酵母株の育種を行った。イソブタノール生産には補酵素であるNADPHの再生と、エタノール生産の阻害が重要と示唆された。FBAに基づきNADPH再生に関わる代謝経路を導入した酵母株は収率が1.45倍に向上した（1.1%）。また、エタノール生産を抑制するため、関連する遺伝子を多重破壊した酵母株は収率が2.9%まで向上した。しかしながらシミュレーション結果（54%）と比べてその収率は非常に低く、活性が低い代謝経路に共通する原因として鉄-硫黄クラスター（ISC）の関わる反応が律速になっていると考察した。第3章では、第2章の考察を元にモデルを再構築した。ISCが関わるFBAモデルの反応に制約を設けて計算したところ、イソブタノール収率の実験値との差異は大幅に減少した(11.7%)。そこで、この改変モデルを用いて再度代謝シミュレーションを実施した結果、ISC反応が関わる物質はターゲットとして不適当であり、一方で2,3-ブタンジオールなどの化合物は酵母での生産に適していることが判明した。そこで、2,3-ブタンジオールをターゲットとしてFBAに基づく代謝改変を実施した結果、予測値（58.9%）に匹敵する2,3-ブタンジオールの収率を達成した（58%）。第4章では、本研究で得られた知見をまとめ、計算機支援型の有用物質生産酵母の育種に関する展望を述べる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（森田　啓介）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教 授	清水　浩
	副 査	教 授	松田　秀雄
	副 査	教 授	若宮　直紀
	副 査	教 授	松田　史生
	副 査	教 授	前田　太郎

論文審査の結果の要旨

近年、有用物質の高生産を目指し、計算機援用遺伝子改変デザインの開発が行われている。その中で、フラックスバランス解析（FBA）は微生物細胞内の簡単な量論式で記述でき代謝状態を効率的な予測可能な手法として、物質生産に応用されてきた。工業的に優れた物質生産微生物の一種である出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）は、バイオエタノールをはじめ、いくつかの化学物質の実生産に用いられている。しかし、FBAに基づく酵母株の育種はしばしばシミュレーション値と実験値が異なる結果となることが問題とされてきた。本研究は、物質生産酵母の計算機援用育種法に焦点を当て、FBA代謝シミュレーションに基づく物質生産株の育種設計を行い、現行の酵母FBAモデルの予測力と株の育種法を調査することを目的としている。現行のFBAシミュレーションで無視される要因を抽出、補完し、結果の相違点から問題の原因となる要因を考察している。さらに、その結果をもとに改良したFBA代謝モデルを構築し、酵母に適した物質生産ターゲットの選定と、育種による検証を試みている。

学位論文は以下の4章で構成されている。

第1章では研究の背景および目的を述べている。

第2章では、イソブタノールをターゲットとしてFBAに基づく酵母株の育種を行っている。イソブタノール生産には補酵素であるNADPHの再生と、エタノール生産の阻害が重要と示唆されたためこのFBAに基づきNADPH再生に関わる代謝経路を導入した酵母株は収率を1.45倍に向上させることに成功している（1.1%）。また、エタノール生産を抑制するために関連する遺伝子を多重破壊した酵母株において収率を2.9%まで向上させることにも成功している。しかし、実際のイソブタノール生産はシミュレーション結果（54%）と比べてその収率は非常に低いことからFBAの改善の必要性があることを指摘している。さらに、活性が低い代謝経路に共通する原因として鉄-硫黄クラスターに関わる反応が律速になっていることを見出している。

第3章では、第2章の考察をもとにFBAモデルを再構築している。FBAモデル中で鉄-硫黄クラスターに関わる反応に制約を設けて再度シミュレーションし、実測データに近い予測値を示すことからモデルの予測性能の向上の鍵が鉄-硫黄クラスターに関わる反応であることを見出している。この改変モデルを用いることで2,3-ブタンジオールなどの化合物が酵母での生産に適していることを提唱している。実際に、2,3-ブタンジオールをターゲットとしてFBAに基づく代謝改変を実施した結果、予測値（58.9%）に匹敵する2,3-ブタンジオールの収率を達成しており（58%）新しいFBAモデルの有効性を実証している。

第4章では、本研究で得られた知見をまとめ、計算機を援用した有用物質生産酵母の育種に関する展望を述べている。以上のように、本研究は、FBA手法を用いた有用物質生産酵母育種のモデル改良とその有効性の実証を行っており、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あるものと認める。