

3. 結果と考察

酸素濃度が変化した場合の野生株大腸菌の発酵生成物パターンの変化を図2に示す。DO濃度が20%以上では、酢酸（ACT）が主な生成物であり、DO濃度が20%以下では、酢酸に加えて、乳酸（LAC）やギ酸（FOR）が生成されることがわかる。DO濃度がさらに減少すると、エタノール（ETH）やコハク酸（SUC）も生成することがわかる。図2のシミュレーション結果の一部（嫌気、好気培養条件）は実験データと一致していることを確認した[6,7]。

図2より、DO濃度が約5%まで低下するにつれて、乳酸生成が増加するが、さらにDO濃度が低下すると、乳酸は減少する。なぜそのような結果になるのか、そのメカニズムを考えてみた。DO濃度が約5%から15%においては、ArcAはピルビン酸脱水素酵素（PDH）のフラックスを抑制し、ピルビン酸ギ酸リアーゼ（Pfl）のフラックスを活性化している。これにより、DO濃度が15%以上のときと比べて、ピルビン酸からアセチル CoA へのトータルのフラックスに顕著な変化は見られない。しかし、NADH/NAD⁺比は、DO濃度が低下するにつれて、著しく増加している。このNADH/NAD⁺比の増加が、乳酸脱水素酵素（LDH）のフラックスを増加させている。NADH/NAD⁺比の増加は、ArcAが呼吸鎖の脱水素酵素（Nuo）を抑制しているからだと考えられる。DO濃度が約5%以下になると、FnrがPflをさらに活性化し、ピルビン酸からアセチル CoA へのフラックスの総量が増加するため、ピルビン酸濃度がさらに減少し、LDHのフラックスが減少する。実際に、嫌気培養条件において、乳酸は他の発酵生成物よりも低くなることが実験によって観察されている[8-10]。

DO濃度が低下すると、FnrやArcAが重要な役割を果たす。このため次に、これらの転写活性因子の欠損が代謝に及ぼす影響について検討した。その結果、嫌気培養条件において、Fnr欠損株では、乳酸生成が増加し[8]、ArcA欠損

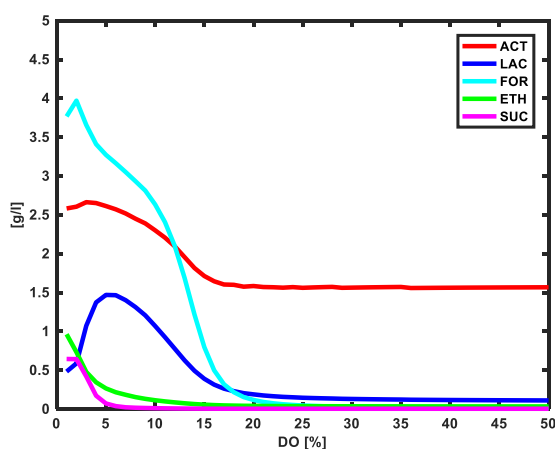


図2 酸素濃度レベルの変化による野生株大腸菌の発酵生成物パターン

株では、エタノール生成が高くなることが分かった[10]。

4. おわりに

本研究で構築した中心代謝反応モデルは、バイオ燃料などの生産を目的とした細胞工場設計のプラットフォームとして有効であると考えられる。実験に主眼を置いた研究者の多くは、特定の代謝経路遺伝子を操作することによって、生産効率を向上させることに焦点を当てている。しかし、生産性、力価、収率といった培養性能がどのようにして、代謝調節制御を介して改善されるのかを理解することは非常に重要である。このような観点から、本研究のような代謝調節制御メカニズムを組み込んだ動力学モデルの開発は実用的にも大きなインパクトを与えると思われる。

参考文献

- [1] Matsuoka, Y. and Shimizu, K. Catabolite regulation analysis of *Escherichia coli* for acetate overflow mechanism and co-consumption of multiple sugars based on systems biology approach using computer simulation. *J Biotechnol.* 2013. 168: 155-173.
- [2] Kotte, O., Zaugg, J.B., Heinemann, M. Bacterial adaptation through distributed sensing of metabolic fluxes. *Mol Syst Biol.* 2010. 6: 355.
- [3] Jahan, N., Maeda, K., Matsuoka, Y., Sugimoto, Y., Kurata, H. Development of an accurate kinetic model for the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2016. 15: 112.
- [4] Henkel, S.G., Ter Beek, A., Steinsiek, S., Stagge, S., Bettenbrock, K., de Mattos, M.J.T., Sauter, T., Sawodny, O., Ederer, M. Basic regulatory principles of *Escherichia coli*'s electron transport chain for varying oxygen conditions. *Plos One*, 2014. 9: e107640.
- [5] Kadir, T.A.A., Mannan, A.A., Kierzek, A.M., McFadden, J., Shimizu, K. Modeling and simulation of the main metabolism in *Escherichia coli* and its several single-gene knockout mutants with experimental verification. *Microb Cell Fact.* 2010. 9: 88.
- [6] Zhu, J., Shimizu, K. The effect of *pfl* gene knockout on the metabolism for optically pure D-lactate production by *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004. 64: 367-375.
- [7] Toya, Y., Nakahigashi, K., Tomita, M., Shimizu, K. Metabolic regulation analysis of wild-type and *arcA* mutant *Escherichia coli* under nitrate conditions using different levels of omics data. *Mol Biosyst.* 2012. 8: 2593-2604.
- [8] Kim, H.J., Hou, B.K., Lee, S.G., Kim, J.S., Lee, D.W., Lee, S.J. Genome-wide analysis of redox reactions reveals metabolic engineering targets for D-lactate overproduction in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2013. 18: 44-52.
- [9] Steinsiek, S., Frixel, S., Stagge, S., Bettenbrock, K., Sumo. Characterization of *E. coli* MG1655 and *frdA* and *sdhC* mutants at various aerobiosis levels. *J Biotechnol.* 2011. 154: 35-45.
- [10] Zhu, J., Shalel-Levanon, S., Bennett, G., San, K.Y. Effect of the global redox sensing/regulation networks on *Escherichia coli* and metabolic flux distribution based on C-13 labeling experiments. *Metab Eng.* 2006. 8: 619-627.