

中心代謝反応系のコンピュータモデル:酸素制限下での発酵性能

松岡結^{†1} 倉田博之^{†1†2}

概要: 近年では、環境保護やエネルギー問題の観点から、微生物を利用した、再生可能資源からのバイオ燃料や医薬品の代謝中間体などの有用物質生産に注目が置かれている。多くの有用物質生産は、酸素制限下で培養が行われることから、そのような発酵性能を評価することができる数学モデルの開発が求められている。本研究では、大腸菌細胞において、酸素濃度の影響を考慮した中心代謝反応系モデルを構築した。酸素濃度レベルが、転写因子の ArcA/B や Fnr を介して、呼吸鎖や発酵経路に及ぼす影響に着目し、発酵生成物パターンがどのように変化するかについて検討した。構築した中心代謝反応系モデルは、好気条件から、微好気、嫌気条件までの代謝をカバーしており、有用物質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。

キーワード: oxygen level, ArcA, Fnr, respiratory chain, NADH/NAD⁺ ratio

1. はじめに

近年では、環境保護やエネルギー問題の観点から、微生物を利用した、再生可能資源からのバイオ燃料や医薬品の代謝中間体などの有用物質生産が注目されてきている。大腸菌は増殖速度が高く、数多くの生物学的知見が存在することから、そのような細胞工場を設計するための、最も有望な微生物である。多くの有用物質生産は、酸素制限下で培養が行われることから、酸素濃度の変化が微生物(細胞)の代謝に与える影響を理解し、発酵性能を評価することができる数学モデルを開発することは重要である。

これまでに、大腸菌の中心代謝経路について、いくつかのモデルが構築されている[1-3]。これらは、炭素源の取り込みや、代謝反応とその制御に注目したモデルであるが、すべて、好気培養条件でのモデルである。有用物質の効率的生産を目的とした細胞工場設計などでは、微好気、あるいは嫌気条件でもシミュレーションが行えるモデルの開発が求められている。そこで本研究では、酸素濃度の影響を考慮した中心代謝反応系モデルを構築した[4]。

2. 方法

本研究における大腸菌の中心代謝反応系モデルを図1に示す。解糖系、ペントースリン酸経路、TCA回路や糖新生経路を含んでいる[1]。嫌気条件では、乳酸、エタノール、ギ酸、コハク酸や酢酸が生成されるため、それらの発酵経路をモデル化した。さらに、この中心代謝反応モデルに加えて、電子伝達系のモデル[5]を組み込んだ。

一般に、細胞の比増殖速度は次式のように、ATP比生成速度(v_{ATP})の関数として表すことができる[6]。

$$\mu = k_{ATP} \cdot v_{ATP} \quad (1)$$

ここで、 k_{ATP} は定数パラメータであり、 v_{ATP} は次式で表される。

$$v_{ATP} = OP + v_{L_Emp} + v_{Pyk} + v_{PTACK} + v_{\alpha KGDH} - v_{Pfk} - v_{Pps} - v_{Pck} - v_{Acs} - v_{Glc} \quad (2)$$

上式のOPは、酸化リン酸化によるATP比生成速度を表しており、以下のように表すことができる。

$$OP = \frac{1}{3}(4 \cdot v_{Nuo} + 4 \cdot v_{Cyo} + 2 \cdot v_{Cyd}) \quad (3)$$

転写因子が代謝経路遺伝子に及ぼす影響は、酵素の最大反応速度を転写因子の関数としてモデル化した。

溶存酸素(DO)濃度に関しては、37℃での飽和溶存酸素濃度を100%とし、完全な嫌気状態を0%として定義した。

基質は、10 g/l グルコースとし、回分培養のシミュレーションを行い、グルコースが消費しつくされた時点での発酵生成物の濃度パターンに着目した。

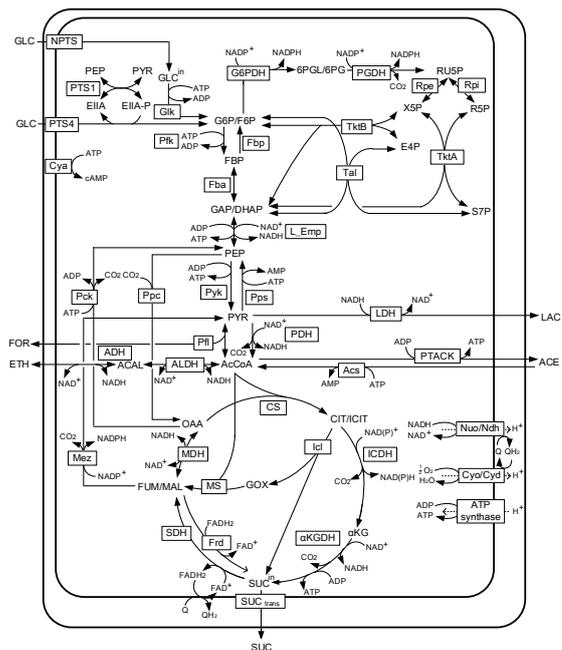


図1 大腸菌の中心代謝経路。

†1 九州工業大学
 Department of Bioscience and Bioinformatics, Kyushu Institute of Technology
 †2 九州工業大学
 Biomedical Informatics R & D Center, Kyushu Institute of Technology

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シミュレーションした結果を図2Aに示す。DO濃度が15%以上では、酢酸(ACE)が主な生成物であった。この現象は、オーバーフロー代謝と呼ばれ、増殖速度の速い大腸菌において、典型的に見られる。DO濃度が減少すると、ギ酸(FOR)、エタノール(ETH)、コハク酸(SUC)濃度が増加した。DO濃度が減少するにつれて、乳酸(LAC)濃度は増加するが、DO濃度が5%以下になると減少した。また、図2Aのシミュレーション結果の一部(微好気、好気培養条件)は実験データと一致していた[7,8]。

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、これらの転写因子の欠損が代謝に及ぼす影響について検討した。図2Bでは、酸素濃度が変化した場合の *fnr* 欠損株の発酵生成物パターンの変化を示す。野生株と比べて(図2A)、*fnr* 欠損株では、コハク酸がほとんど生成されていないことが分かる。これは、FrdがFnrによって制御されていることに起因している。また、低いDO濃度において、*fnr* 欠損株では野生株と比べて、乳酸生成が増加することがわかった。

図2Cには、酸素濃度が変化した場合の *arcA* 欠損株の発酵生成物パターンの変化を示す。DO濃度が10%から2%に低下したとき、酢酸生成が減少することがわかる。野生株や *fnr* 欠損株と比べて(図2A, B)、DO濃度が6%以下において、エタノール生成が高くなり、このシミュレーション結果は、微好気培養条件での実験データと一致している[9]。しかしながら、嫌気培養条件では、*arcA* 欠損株のエタノール生成速度は、野生株と同程度であるという実験データが報告されており、シミュレーション結果とはやや異なっている[9]。これは、シミュレーションでは、実験よりも、NADH/NAD⁺比が高くなったためと考えられる。高い

レベルのNADH/NAD⁺比は、アルコール脱水素酵素(ADH)の反応を促進し、エタノール生成を増加させるからである。

4. おわりに

本研究で構築した中心代謝反応モデルは、バイオ燃料や医薬品の代謝中間体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。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。

参考文献

- [1] Matsuoka, Y., 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] Matsuoka, Y., Kurata, H. Modeling and simulation of the redox regulation of the metabolism in *Escherichia coli* at different oxygen concentrations. *Biotechnol Biofuels*, 2017. 10: 183.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Levanon, S.S., San, K.Y., Bennett, G.N. Effect of oxygen on the *Escherichia coli* ArcA and FNR regulation systems and metabolic responses. *Biotechnol Bioeng*, 2005. 89: 556-564.

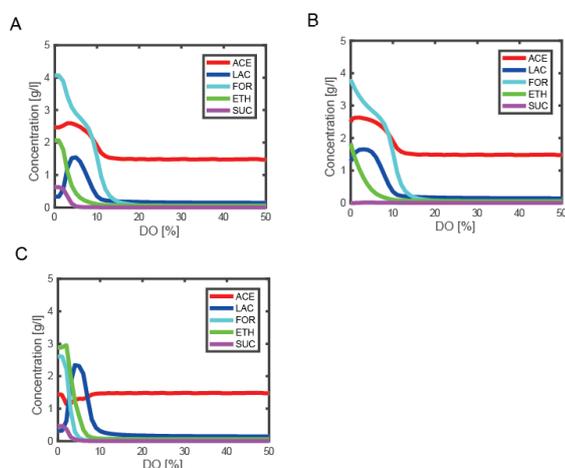


図2 酸素濃度レベルの変化による大腸菌の発酵生成物パターン。A) 野生株, B) *fnr* 欠損株, C) *arcA* 欠損株。