

2018年度 生物学功績賞 受賞



計算機工学に基づく代謝設計とその有効性の実証に関する研究

清水 浩



In silico Metabolic Pathway Design and Flux Analysis for Bio-Production

Hiroshi Shimizu (*Department of Bioinformatic Engineering, Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University, 1-5 Yamadaoka, Suita Osaka 565-0871 Japan*)
Seibutsu-kogaku 97: 13-20, 2019.

はじめに

微生物が元来持っている物質生産の能力を生かすのに加えて、生産収率や生産速度の向上を目的とした合理的な育種へ向けての生物学手法の確立が重要である。多くの生物のゲノム情報が明らかとなるとともに、生命の営みを遺伝子、タンパク質、代謝の各階層で解析する技術が急速に発展してきており、そこから生まれたデータをうまく利用して効果的な微生物生産法を開発したい。遺伝子を効率よく操作、編集する技術も格段に進歩しているため、育種戦略を高速に立てて実行することも重要である。生物学においてデータが豊富に扱える時代であって、大量多変量のデータを駆使した生物創成の設計を行うために、計算機を援用した方法の開発が重要と考えた。歴史を紐解けば、1970年代に合葉らは、「生物化学工学は、生物学という生命の本質を明らかにする科学分野に、工学設計という概念を持ち込んだ」ことを『生物化学工学』の中で述べている¹⁾。この時代、多くのケースにおいて細胞をブラックボックスとして扱っているが、代謝を定量的に記述し、解析しようという研究も古くからあり、たとえば、1970年代には、すでに遠藤らが代謝の定量的記述を試みている²⁾。また、アミノ酸、核酸発酵を中心に優れた形質をもつ微生物のスクリーニングや変異育種による代謝の最適化、さらには遺伝子工学技術による細胞改良により非常に多くの工業微生物育種が成功しており、今日までの発酵産業を支える基盤を形成してきた³⁾。その後、微生物の代謝経路を物質収支

の概念を基礎に解析し、合理的に改良することで、目的生産物の生産収率や生産性を効果的に向上させる代謝工学^{4,5)}、合成生物学⁶⁾が大きく発展してきた。

筆者らは、代謝物質の物質収支や反応速度論の概念に立脚し、より統一的に生命現象を取り扱えるプラットフォームを構築して、「計算機工学に基づく代謝工学」分野を開拓してきた。すなわち、微生物生産において代謝反応の大きさをフラックスという概念を用いて定量化することで代謝の解析と設計を統一的に行うことを考える。細胞内には多くの代謝反応が存在するが、その反応速度の大きさをモル基準で、単位細胞当たり、単位時間当たりの反応の大きさ(代謝フラックス [mol/h/cell])と表現する。

計算機工学に基づく代謝設計と解析の概要

図1に、研究の概要を示す。全体は、1) 代謝フラックスバランス解析による代謝設計(生産収率の最適化)、2) ¹³C代謝フラックス解析による細胞評価、3) 代謝鍵反応の同定(生産性の向上)に分けることができる。ゲノムスケールで代謝モデルを構築し、これを用いて目的物質生産収率を最大化するための遺伝子改変を考える。この設計に基づいて実際に生産菌を育種する。育種された細胞の性能を評価するため実際に培養を行って¹³C代謝フラックス解析により、生産菌の代謝状態を調べる。また、代謝反応の中に淀みがあるかどうかを調べて問題のある場合は鍵となっている反応を同定し、律速段階を解除することで生産性の高度化を図る。

著者紹介 大阪大学大学院情報科学研究科(教授) E-mail: shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

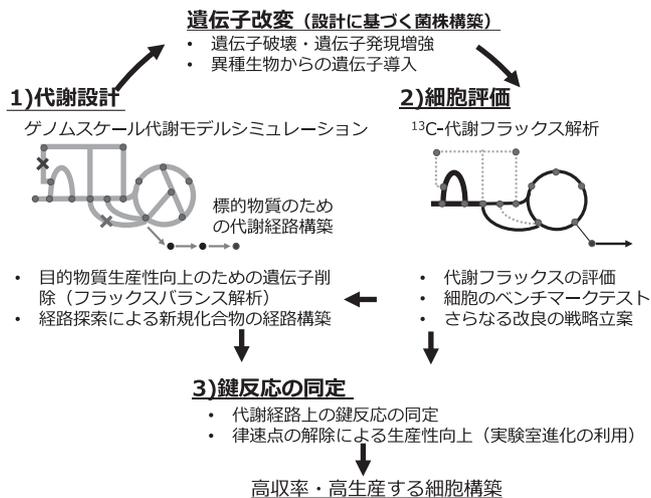


図1. 計算機工学に基づく代謝設計と解析研究の概要

代謝フラックスバランス解析による代謝設計 (生産収率の最適化)

筆者らは、細胞の代謝を多段階反応プロセスとして捉え、細胞内の代謝フラックスを統一的に計算機で扱えるよう整理し、目的物質を高収率で生産可能な代謝経路を設計する方法を開発してきた。代謝経路は、複雑に入り組んでおり、同じ物質に到達するにも異なる経路が存在したり、逆反応が存在し、生成したものが反応物に戻されたりする。また、目的物質を生成するために必要なエネルギー物質 (ATP) や還元力 (NADH, NADPH) は、生成や消費がうまくバランスされていないと定常的な細胞の生産能力につながらず、注意する必要がある。これらのことを統一的、かつ、効果的に検討できる計算工学基盤 (プラットフォーム) の開発を行った。まず、代謝反応を化学量論式として記述する。化学量論とは、代謝マップに集約された反応式 (たとえば、ヘキソキナーゼ: $\text{グルコース} + \text{ATP} \rightarrow \text{グルコース-6-リン酸} + \text{ADP}$) での反応物と生成物の量的な関係である。

フラックスバランス解析 (flux balance analysis: FBA) は、反応の化学量論だけに着目し、代謝全般にわたって解析する方法である⁷⁻⁹⁾。代謝モデルには酸素や栄養源の取り込みフラックスや発酵産物の培地への排出フラックスも扱うことができるので、炭素源や窒素源の違い、通気条件、代謝反応の有無が目的化合物の生産収率に及ぼす影響を解析できる。一方で、代謝の動的な解析や代謝物質濃度と反応速度の関係 (カインेटクス) などは扱えない。たとえば、代謝フィードバック制御の影響、発酵の時間的な変化などは予測できない。このような制約はあるが、FBAができることを最大限に生かすことで、さまざまな応用が行える。

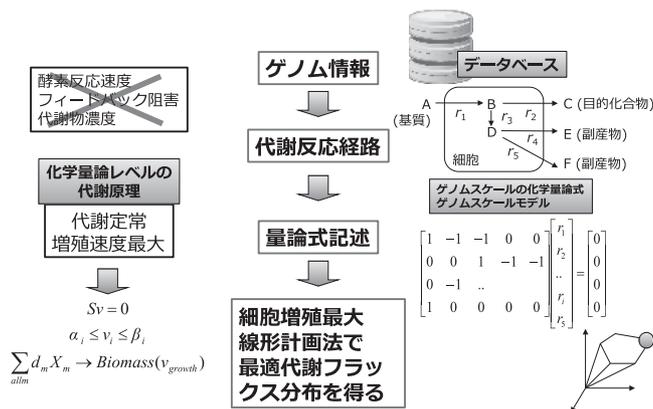


図2. ゲノムスケールモデルの構築と計算機工学における実装

代謝反応を化学量論式で記述することで定常状態における代謝フラックス間の関係を線形代数方程式で記述することができる。細胞内に存在する代謝反応を全般的に集めてくれば、ゲノムワイドな代謝モデルとなる。

ゲノムスケール代謝モデルの構築と 代謝フラックス予測

図2に代謝モデルの構築の手順と実装の概要を示す。筆者らは、重要な微生物のゲノムスケール代謝反応モデルを構築し、代謝フラックスバランス解析法 (FBA) により環境変化、遺伝子導入・削除によってもたらされる代謝フラックスや、取り込む栄養源の種類などを精度よく予測することに成功した¹⁰⁻¹²⁾。

筆者らは、この方法の予測性能を検証するために、コリネ型細菌のゲノムスケール代謝モデルを自ら構築するとともに、グルコースの取り込みフラックスに対して酸素の供給をさまざまに変化させた実験を行って、計算機で予測された乳酸、酢酸、コハク酸などの有機酸の生成フラックスが定常の実験データをよく説明することを見いだした¹⁰⁾、シアノバクテリアについても異なる栄養条件の代謝状態¹¹⁾、すなわち、与えられた環境状態に対して細胞の代謝フラックスがどのようになるかを計算予測することが可能となったと言える。シミュレーションにより実験データを説明可能であることが分かったので、この方法を用いて目的物質を最大生産するための不要な反応経路、効果的な補酵素の利用を行うための遺伝子削除について、計算機上で設計することが可能となった。ゲノムスケールの代謝モデルはゲノムが明らかになった生物数の上昇とともに多くなっており、多くの生物のゲノムスケールの代謝モデルの利用が可能である¹³⁾。

遺伝子削除については、計算機上では、その遺伝子が関与する代謝のフラックスを強制的にゼロにすることで設定が可能である。このような制約を設定したうえで同

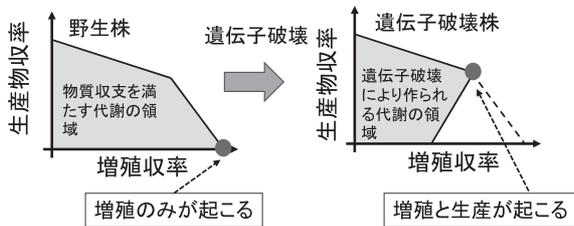


図3. 増殖連動型生産のための遺伝子破壊の設計

じように計算を行うことにより遺伝子削除がもたらす代謝状態を知ることができる。図3に概念的な図を示すが、取り込まれた栄養源は通常細胞増殖を最大化するように代謝されるので、野生株では増殖に必要な物質を生産しないが、戦略的に遺伝子を削除して、それでもなお細胞が増殖を最大化するために必然的に目的物質を作らなければならない状態を設計することが可能である。もちろん、この際には、目的物質に対して不要な副生物生産の除去も行うことができる。野生株と比較すると細胞増殖は低下する傾向となるが、増殖と生産を連動（カップリング）させることによってその条件でも細胞自身が自らを増やすために栄養をエネルギー、還元力、構成要素などに変換する駆動力を利用することで物質生産にとって好ましい状態を作り出すことができる。

このようなプラットフォームが整えば、細胞全体を見渡してすべての遺伝子を対象に目的物質をもっともよく生産するための改良（削除）を行うこと、これを多重に行うことなど、実験では多くの労力や時間がかかることを計算することが可能となる。また、計算量が膨大になるため、従来、探索が困難であった10を超えるような多重遺伝子破壊スクリーニングの方法¹⁴⁾や、増殖に連動させずに（停止期に）目的物質生産を最大化する代謝設計¹⁵⁾の方法を確立した。

3-ヒドロキシプロピオン酸（3HP）の生産性向上の代謝設計

大腸菌においてグルコースやグリセロールを単一炭素源として用い、化学物質（1-ブタノール、1-プロパノール、1,3-プロパンジオール、3-ヒドロキシプロピオン酸）に対する目的物質生産収率を最大にするための3重遺伝子破壊から最適なものを選択する方法の開発¹⁶⁾を行った。さらに、大腸菌による3-ヒドロキシプロピオン酸（3HP）の生産性向上の設計に基づいて有効性を検証した。大腸菌を宿主とし、*Klebsiella pneumoniae*の*dhaB*と*gdrAB*の導入と、大腸菌の*aldH*を過剰発現することで、グリセロールを基質とした大腸菌3HP生産株を構築した。図4に示すようにM9合成培地にて培養を行っ

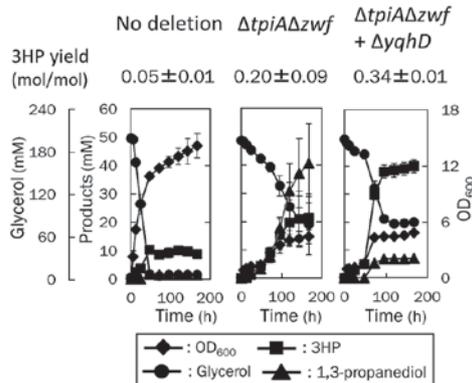


図4. 大腸菌を用いた3-ヒドロキシプロピオン酸（3HP）の生産性向上の有効性の実証

た結果、3HP生産収率は5%となった。次に、大腸菌の代謝モデルに対し、FBAを用いた遺伝子破壊シミュレーションを行い、生産収率の向上が期待できる遺伝子破壊を探索した。探索結果に基づいて*tpiA*と*zwf*の2重遺伝子破壊を行った結果、収率は20%に増加した。さらに、主な副産物である1,3-プロパンジオールの生合成に関わる*yqhD*を破壊すると収率を34%に向上させることに成功した¹⁷⁾。このように、計算プラットフォーム上で得られた遺伝子破壊シミュレーションによる標的化合物の生産性の向上が実際の遺伝子破壊によって有効であることが確認された。同様の方法はシアノバクテリアにおけるエタノール生産にも応用され、光化学系に関連する遺伝子を破壊し還元力をエタノール合成により利用することで効果的なエタノール生産が達成されることが実証された¹⁸⁾。また、酵母による乳酸生産のためのエタノール合成の遺伝子破壊戦略^{19,20)}にも応用された。

新規化合物を生成する代謝設計

必要な反応を付加するために異種の生物から遺伝子を導入することで、元来は生産できない化学物質を生産するための代謝設計を行うことも重要である。宿主に、データベース上に存在する反応を宿主が持っている代謝物質から出発して1ステップずつ反応を付加し、生産可能性のある物質を網羅的に調べ上げ、新規な生産化合物をリストアップする。微生物ごとに連結可能な反応経路をあらかじめ用意しておけば、効果的に、どの細胞で何を作りやすいかなどの設計が可能となる。いったん、生産可能性がリストアップされれば、その標的化合物をもっともよく生産するようにFBAを用いて遺伝子を削除していくことで生産株が最適設計されていくこととなる（図5に新規化合物の代謝設計の方法を示す）^{21,22)}。

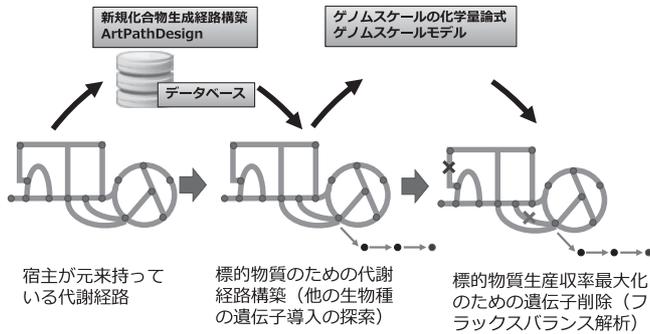


図5. 新規化合物の生成する代謝の設計

¹³C代謝フラックス解析による細胞評価

実際に細胞内で起こっている代謝フラックスを精度よく捉えることは、発酵プロセスの解析に強みを発揮する。日本では、慶應大学の清水らの先駆的な研究がある^{23,24}。この方法は、培養工学、分析化学、計算機工学があいまって精度の良いフラックスを出すことができる。しかし、計算機工学でのモデリング、フラックス解析、推定精度評価などさまざまな側面からの検討を必要とする。筆者らは、種々の微生物プロセスへの適用を利用者になるだけ容易に行えるように解析法のプラットフォーム開発²⁵⁻²⁸)を行ってきた。¹³C代謝フラックス解析法は、培養中に安定同位体¹³Cを含む栄養源を細胞に取り込ませて、その同位体標識の代謝物質への蓄積量を質量分析によって解析し、微生物の代謝フラックスを推定する方法である。方法の概要について図6に示す。細胞を培養すると炭素源や窒素源を取り込みながら生産物を排出し、細胞は増殖する。ステップ1では、細胞へ取り込まれたり、排出されたりする物質の情報を集め、細胞の内外の物質収支を確認する。細胞内の代謝フラックスの分岐の割合は細胞内外の収支だけではわからないので、ステップ2では、¹³C同位体標識された栄養源を取り込ませ代謝物質への¹³C標識蓄積量のデータを集める。たとえば、グルコースが解糖経路を通過してピルビン酸になったのか、ペントースリン酸経路を經由して同じ物質に到達したのかは細胞の外からだけではわからない。しかし、1位に安定同位体¹³Cで標識されたグルコース([1-¹³C]グルコース)を細胞に取り込ませ、その¹³C標識がどのような代謝物にどの程度濃縮されているかを測定することで、どの経路が活性化されているかを知ることができる。取りこまれたグルコースの1位にある炭素原子は、ペントースリン酸経路を通過して代謝された場合は6炭糖から5炭糖に変換される際に、CO₂として分子の炭素骨格から離脱するので[1-¹³C]グルコースを細胞に取り込ませながら培養した後、下流の代謝物質(ピ

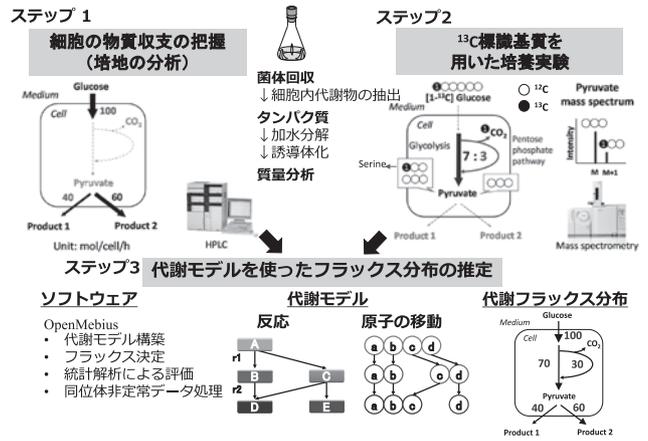


図6. ¹³C代謝フラックス解析方法の概要

表1. ¹³C代謝フラックス解析のためのプラットフォーム・OpenMebiusの主な機能

- 1) 代謝反応における分子間の原子移動などの情報からの解析用モデルの自動構築
- 2) 精度の高いフラックス解析結果を得るための実験設計
- 3) 実験データを用いた代謝フラックス解析
- 4) 得られた代謝フラックスの統計的な信頼区間の推定
- 5) ¹³C濃縮度の時間変化(動的)データを用いた代謝フラックス解析

ルビン酸)の標識割合のデータからフラックスの分岐割合を決定することができる。定量性の良さからタンパク質中に取り込まれたアミノ酸(セリン)の¹³C標識割合を測定することで代謝フラックスを決定することが多く行われてきた。最近では、さまざまな代謝物質の¹³C標識割合に基づいて代謝フラックスの分布を決定することが可能になってきている。細胞から代謝物質を抽出し、その¹³C標識濃縮度をガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)など、分離装置と質量分析装置を用いて定量する。得られた¹³C標識割合のデータをもっともよく説明する代謝フラックス量を計算機で決定する⁹⁾。

この方法を中枢炭素代謝全体で行うためには、各反応における反応物と生成物の原子の移動を表すモデルが必要である。代謝物質の質量分析においては、¹³C同位体を含む分子の標識割合が測定できる。代謝フラックスの決定においては、代謝フラックスを仮定し、そこから得られる各代謝分子の濃縮割合を計算して実測値と比較して仮定が正しかったかを検証する。実測と計算がずれている場合は代謝フラックスを仮定し直し、ずれが十分小さくなるまで計算を繰り返す。このような実験データを説明する代謝モデルを手動での構築や代謝フラックスの決定は、繰り返し計算も含めて色々な計算機での作業が

必要となる。筆者らは、 ^{13}C 代謝フラックス解析のためのオープンソフトウェアOpenMebiusを開発し公開している²⁶⁾。このOpenMebiusの主な機能を示すと表1のようになる。

この方法によって、コリネ型細菌^{25,29)}、大腸菌^{30,31)}、シアノバクテリア³²⁻³⁴⁾、出芽酵母³⁵⁾、枯草菌³⁶⁾などの代謝の様態が実験的に解明されており、また、これらの微生物を用いたグルタミン酸^{37,38)}、メバロン酸^{39,40)}、イソプロピルアルコール⁴¹⁾、S-アデノシルメチオニン^{42,43)}などの生産において、代謝解析とそれに基づく代謝改良戦略立案に応用され、生産性の向上を実現することで、有効性が実証されている。また、上述のFBA代謝設計法と組み合わせること⁴⁰⁾で有用微生物の設計と細胞評価のサイクルの加速化が実現された。

^{13}C 代謝フラックス解析による メバロン酸生産大腸菌の評価

メバロン酸はさまざまな用途に展開できる化合物である。大腸菌などを用いてメバロン酸生産が試みられている。このメバロン酸生合成経路を導入した大腸菌の代謝状態を調べることで、さらなる改良の戦略を練ることを考えた。

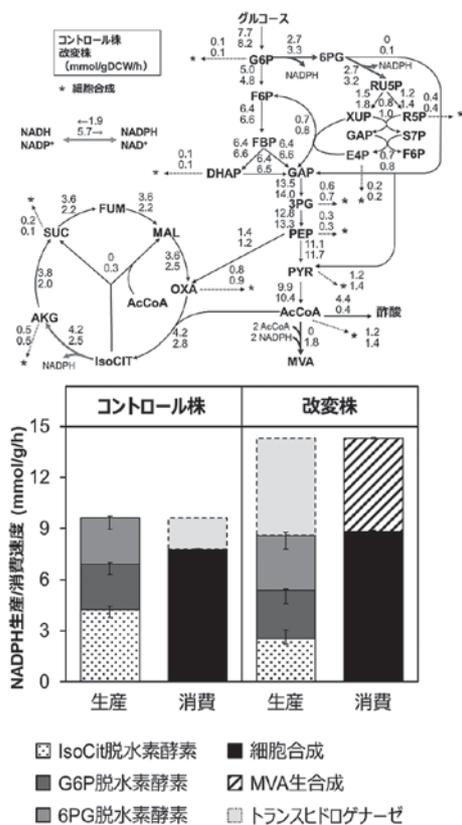


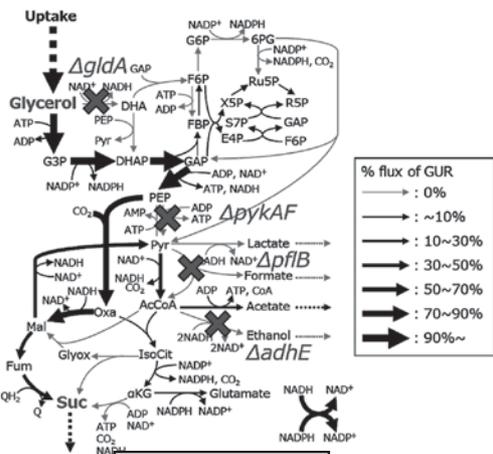
図7. メバロン酸生産大腸菌における代謝フラックス解析結果とNADPHの生成と消費のバランスの概観

図7の上段にはメバロン酸非生産大腸菌（コントロール株）の代謝フラックス結果、下段には、生産大腸菌の代謝フラックスを示す。メバロン酸生産は行っているが、さらなる改良を考える余地はある。この物質を生産するためには最終段階においてNADPHの還元力を必要とするため、細胞の中核代謝でその消費、再生のバランスがどのようになっているかを知ることは重要と考えられる。本解析法の一つの長所は、細胞内の反応の大きさを定量化しているため補酵素の消費、再生がどのような状態にあるかも量的に把握できることにある。図7にコントロールと生産菌のNADPHの消費と生成の状態を示すが、NADPHがどの代謝反応でどのように使われたり再生したりしているのかが理解できる。生産菌では代謝系における生成に比較して細胞合成やメバロン酸合成で利用する消費量の方が上回っており、バランスが取れているとは言い難い。このバランスが取れていない量は、トランスヒドロゲナーゼによって調整されていると考えられるが、より効率的なNADPHの再生を可能とする代謝状態を取るよう代謝改変を行うことがさらなる生産性の向上につながると考えられる⁴⁰⁾。

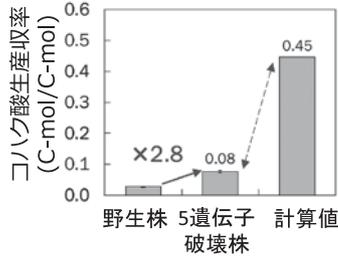
生産性を向上させるため代謝鍵反応の同定

収率の最適化に加えて最大の生産速度をもたらす代謝系を持つ微生物の設計は非常に重要である。多数の反応が関わる代謝系では、どの反応が生産性向上をもたらす鍵となる反応かを同定することが容易ではない。酵素量を増減させた際に目的物質をもっとも感度を高く変化させる、そのような反応の同定法の理論フレームワークは代謝制御解析 (metabolic control analysis: MCA) と呼ばれており、理論的な側面が古くから先行して研究が進んでいる⁴⁴⁻⁴⁷⁾。筆者らも遺伝子や酵素の発現量を変動させた際の代謝フラックス解析を行って重要反応を同定する実験解析法を開発し、大腸菌⁴⁸⁾、コリネ型細菌のリジン発酵⁴⁹⁾、グルタミン酸発酵⁵⁰⁾の代謝制御メカニズム解析などへ適用した。

最近では、Gibbsの自由エネルギー変化⁵¹⁾や、動的なモデル⁵²⁾を利用して解析を行う試みも本格化しているが、ここでは触れない。本稿では化学量論式をベースに反応速度論を排除することでゲノムワイドに代謝を取り扱ってきたので、その発展として生産性向上のための代謝鍵反応の同定についての研究成果について述べる。グリセロールを炭素源としたコハク酸生産大腸菌の育種にフラックスバランス解析法を応用したところ、図8に示すように野生型の大腸菌と比べて、5遺伝子の破壊を行う設計指針がたったため実際に破壊株を作製し、野生株と比較して2.8倍高いコハク酸生産収率を示す遺伝子破壊



代謝改変設計



代謝改変の実際

図8. グリセロールを炭素源とするコハク酸生産大腸菌の多重遺伝子破壊の設計とその実験結果

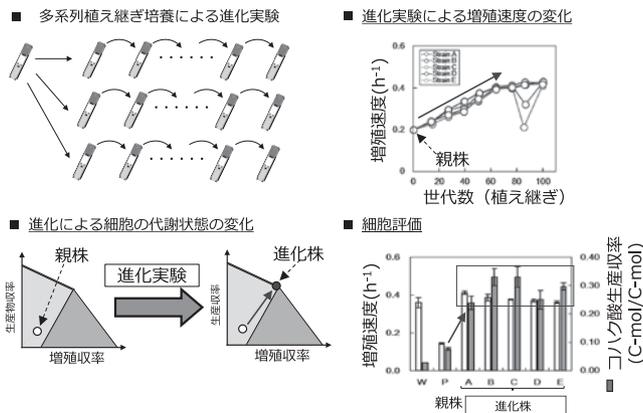


図9. 実験室進化における生産株の改良

株の構築に成功した。しかし、FBAで予測された生産性と比べて低い値となった。FBAでは酵素のカイネティクス情報が考慮されていないため、遺伝子破壊直後の株においては何らかの代謝反応が律速となり、細胞増殖に最適な状態に移行できないために予測値よりも低い生産性を示したと考えられた。

そこで、図9に示すように構築した遺伝子破壊株（親株と呼ぶ）に対し実験室進化を行い、自然変異を通じて増殖速度の上昇した進化株を構築することで、コハク酸

■ 到達可能領域の拡大（フィードバック阻害の解除） ■ コハク酸生産改良のメカニズム

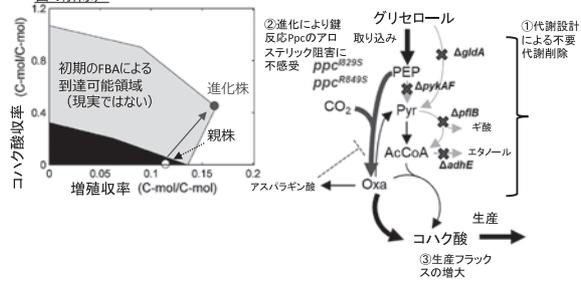


図10. コハク酸生産を高度化するプロセスと鍵反応の同定

生産性の向上を試みた。植え継ぎ培養により独立した5系列の進化実験を行ったところ、すべての系列の進化株（100世代目）では進化前に比べて、コハク酸収率が3.1~4.3倍に向上した。さらに、バイオリクターを用いて酸素供給条件を調節した結果、進化株はフラックスバランス解析の予測と等しい0.44 g/gのコハク酸収率を達成した。

進化実験による有用菌株育種では、変異率が少ないため、適応進化に有効な遺伝子変異を容易に同定できる。進化株において、コハク酸生産が向上した機構を解明するため、次世代シーケンサーによる全ゲノム変異解析を行ったところ、全株が遺伝子変異を1~3個持ち、特に共通してホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（Ppc）をコードする *ppc* 遺伝子上に非同義変異を引き起こす1塩基置換が確認された。そこで、親株のゲノム上に発見された変異を導入したところ、増殖速度とコハク酸生産性が上昇した。さらに、タンパク質構造モデルを用いて変異箇所を解析したところ、確認された非同義変異はいずれも共通の α -ヘリックス鎖上に位置し、この α -ヘリックス鎖にはアロステリック阻害物質であるアスパラギン酸の結合部位が存在することが確認された。*In vitro*でのPpc酵素活性測定を行ったところ、アスパラギン酸の存在下で野生型は活性値を80%程度低下したのに対し、同定された変異型はアスパラギン酸に非感受性の表現型を示した。これより、進化株は1塩基置換によりPpcへのアスパラギン酸による阻害を解除させ、コハク酸の生産性が高い増殖に最適な代謝状態へと適応進化したことが明らかになった。

図10にこれらのプロセスをまとめる。5遺伝子の破壊によって不要経路やコハク酸生産を可能とする代謝の基本設計を行った。しかし、鍵となるPpcがアスパラギン酸によるアロステリック阻害を受けるため、そのことが全体の代謝の律速となって大きな生産は実現されなかった。しかし、進化実験を行うことによって細胞増殖に連動してコハク酸生産を進化させることでPpcにアロステ

リック阻害に対して不感受となる変異が導入され、コハク酸生産は理想的な状態に近くなるほど生産量が改良された。FBAは反応速度論を無視して代謝を設計するので現実の細胞が速度論的制約を受ける場合には乖離が生じる。しかし、増殖連動型で物質生産を最適化するように遺伝子改変の設計がなされているので、増殖を進化によって上昇させると生産性も自然と上昇するようになっているところに本手法の特長がある⁵³⁾。

おわりに

微生物の代謝を利用したバイオプロセスは多段階の反応を一気に進め目的物質を得るところにメリットがある。しかし、多段階だからこそ、全体をシステムとして理解し、設計する手法の開発が重要である。天然に存在する能力の高い生物の探索が重要であるのは論を待たないが、既存の細胞や遺伝子資源の膨大な情報を効率よく組み合わせ、高度に利用する手法を展開していくことも生物学の大きな役割であると考えている。ゲノム情報が得られたことにより、ブラックボックスであった細胞は、境界をきっちり定義することが可能な生命システムへと変貌を遂げた。それによって、改良のための計算機工学プラットフォームの構築とそれに基づく細胞の育種が現実のものとなり、計算で得られた予測と現実の細胞の性能の比較を行えることで、今後加速度的に両方の手法が発展していくと期待している。

FBAや¹³C代謝フラックス解析は物質の収支を主要な記述方法にして代謝を統一的に理解することを可能とし、多くの生物の優良株育種、バイオプロセスの開発へと応用されてきた。手法には長所と短所があり、シミュレーションで何でもわかるということはあるが、本稿で述べたような計算機工学基盤に代謝設計の議論ができるようになってきており、計測技術の進展と相まって工学利用価値のあるレベルに到達した。細胞というシステムのスケールで言えば、ゲノムワイド(細胞全体)、中枢代謝、主要分岐点、鍵と異なる一反応といったように、異なるスケールのシステムも考えながら目的に向かって細胞を高度化していくことができるようになってきた。ちょうど試験管レベルから大規模発酵槽のレベルまで見渡して微生物反応を取り扱う生物化学工学が発酵槽の設計や運転法の開発において大きな貢献をしたように、代謝工学は、細胞全体から一反応までを見渡して育種を行うための技術となり得る。コハク酸生産の例で、最初はゲノムワイドな代謝改変から始まって最後に酵素の反応速度論に話が落ち着いたように、細胞全体から一反応までを見渡した育種研究やバイオプロセス開発が今後ますます盛んになると考えている。

本稿で述べた代謝工学の発展は今や生物化学工学の一部にとどまらず、システムバイオロジー、細胞生物学、光合成科学、などあらゆる生命科学分野に波及している。データリッチな時代にあつて生物工学に果たす役割は拡大すると予想される。

謝 辞

この度、栄誉ある2018年度生物工学功績賞を頂くこととなりました。多くの先生方にご指導いただいたおかげでこのような研究につながったと思います。学生時代から「生物はシステムである」というものの見方をお教えた塩谷捨明先生(大阪大学名誉教授)、情報科学、生物化学工学などご指導いただいた吉田敏臣先生(大阪大学名誉教授)、菅健一先生(大阪大学名誉教授)、米国留学時代に代謝工学の重要性に触れさせていただいたGregory Stephanopoulos先生(米国MIT教授)に衷心よりお礼申し上げます。また研究室のスタッフとして苦勞を共にし、研究を拓いていただいた松田史生先生(阪大教授)、古澤力先生(理研研究員、東大教授)、戸谷吉博先生(阪大准教授)、平沢敬先生(東工大准教授)、豊島正和先生(阪大特任助教)、吉川勝徳博士、白井智量博士(理研研究員)、小野直亮先生(奈良先端大准教授)、永久圭介博士に心よりお礼申し上げます。共同研究で、新しいアイデアを吹き込んでいただいた近藤昭彦先生(神戸大)、小笠原直毅先生(奈良先端大)、福崎英一郎先生(阪大)、James Liao先生(UCLA, 現Academia Sinica)をはじめ、アカデミア、産業界の共同研究者の皆さんとの出会いにより研究を行うことができました。最後に、ここに示す研究は徳山健斗博士、和田圭介博士、岡橋伸幸博士、大野聡博士、梶島秀一博士、仲嶋翼博士、堀之内貴明博士、早川謙詞博士、井田祥弘博士、Sunisa Chatsurachai博士、森英詞博士、Siraje Arif Mhamud博士、Riyanto Her Nugroho博士、Jianhon Ou博士、Thai Nho Dihn博士、Jongpill Kim博士、山田忠司博士をはじめ研究室の卒業生を含めた学生諸氏、教職員の努力の賜物です。心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) 合葉修一, ハンフリー, A., ミリス, N.: 生物化学工学, 東京大学出版会(1973).
- 2) 遠藤 勲, 井上一郎: 化学工学論文集, **2**, 416–420(1976).
- 3) Yokota, A. and Ikeda, M.: *Amino Acid Fermentation, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **159**, Springer(2016).
- 4) ステファノポーラス, G., アリスティド, A., ニールセン, J. 著, 清水 浩, 塩谷捨明 訳: 代謝工学—原理と方法論—, 東京電機大学出版局(2002).
- 5) Shimizu, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 563–573(2002).
- 6) Kondo, A., Ishii, J., Hara, K. Y., Hasunuma, T., and Matsuda, F.: *J. Biotechnol.*, **163**, 204–216(2013).
- 7) Feist, A. and Palsson, B.: *Nat. Biotechnol.*, **26**, 659–667(2008).
- 8) Toya, Y. and Shimizu, H.: *Biotechnol. Adv.*, **31**, 818–826(2013).
- 9) Matsuda, F., Toya, Y., and Shimizu, H.: *Biotechnol. Adv.*, **35**, 971–980(2017).
- 10) Shinfuku, Y., Natee, S., Sono, M., Furusawa, C.,

- Hirasawa, T., and Shimizu, H.: *Microb. Cell Fact.*, **8**, 43 (2009).
- 11) Yoshikawa, K., Kojima, Y., Nakajima, T., Furusawa, C., Hirasawa, T., and Shimizu, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92**, 347–358 (2011).
 - 12) Yoshikawa, K., Aikawa, S., Kojima, Y., Toya, Y., Furusawa, C., Kondo, A., and Shimizu, H.: *PLoS ONE*, **10**, e0144430 (2015).
 - 13) Oberhardt, M. and Palsson, B.: *Mol. Syst. Biol.*, **5**, 320 (2009).
 - 14) Ohno, S., Shimizu, H., and Furusawa, C.: *Bioinformatics*, **30**, 981–987 (2014).
 - 15) Toya, Y., Shiraki, T., and Shimizu, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **112**, 759–768 (2015).
 - 16) Ohno, S., Furusawa, C., and Shimizu, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 221–228 (2013).
 - 17) Tokuyama, T., Ohno, S., Yoshikawa, K., Hirasawa, T., Tanaka, S., Furusawa, C., and Shimizu, H.: *Microb. Cell Fact.*, **13**, 64 (2014).
 - 18) Yoshikawa, K., Toya, Y., and Shimizu, H.: *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **40**, 791–796 (2017).
 - 19) Ida, Y., Furusawa, C., Hirasawa, T., and Shimizu, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 192–195 (2012).
 - 20) Ida, Y., Hirasawa, T., Furusawa, C., and Shimizu, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 4811–4819 (2013).
 - 21) Chatsurachai, S., Furusawa, C., and Shimizu, H.: *BMC Bioinformatics*, **13**, 93 (2012).
 - 22) Chatsurachai, S., Furusawa, C., and Shimizu, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 524–527 (2013).
 - 23) Hua, Q., Yang, C., Baba, T., Mori, H., and Shimizu, K.: *J. Bacteriol.*, **185**, 7053–7067 (2003).
 - 24) Ishii, N., Nakahigashi, K., Baba, T., Robert, M., Soga, T., Kanai, A., Hirasawa, T., Naba, M., Hirai, K., Hoque, A., Ho, P. Y., Kakazu, Y., Sugawara, K., Igarashi, S., Harada, S., Masuda, T., Sugiyama, N., Togashi, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Yugi, K., Arakawa, K., Iwata, N., Toya, Y., Nakayama, Y., Nishioka, T., Shimizu, K., Mori, H., and Tomita, M.: *Science*, **316**, 593–597 (2007).
 - 25) Shirai, T., Matsuzaki, K., Kuzumoto, M., Nagahisa, K., Furusawa, C., Shioya, S., and Shimizu, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 413–424 (2006).
 - 26) Kajihata, S., Furusawa, C., Matsuda, F., and Shimizu, H.: *Biomed Res. Int.*, 627014 (2014).
 - 27) Okahashi, N., Kajihata, S., Furusawa, C., and Shimizu, H.: *Metabolites*, **4**, 408–420 (2014).
 - 28) Maeda, K., Okahashi, N., Toya, Y., Matsuda, F., and Shimizu, H.: *Metab. Eng. Commun.*, **3**, 187–195 (2016).
 - 29) Umakoshi, M., Hirasawa, T., Furusawa, C., Takenaka, Y., Kikuchi, Y., and Shimizu, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 595–601 (2011).
 - 30) Mori, E., Furusawa, C., Kajihata, S., Shirai, T., and Shimizu, H.: *Biotechnol. J.*, **6**, 1377–1387 (2011).
 - 31) Toya, Y., Ohashi, S., and Shimizu, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **125**, 301–305 (2018).
 - 32) Toya, Y., Hirasawa, T., Morimoto, T., Masuda, K., Kageyama, Y., Ozaki, K., Ogasawara, N., and Shimizu, H.: *J. Biotechnol.*, **179**, 42–49 (2014).
 - 33) Nakajima, T., Kajihata, S., Yoshikawa, K., Matsuda, F., Furusawa, C., Hirasawa, C., and Shimizu, H.: *Plant Cell Physiol.*, **55**, 1605–1612 (2014).
 - 34) Nakajima, T., Yoshikawa, K., Toya, Y., Matsuda, F., and Shimizu, H.: *Plant Cell Physiol.*, **58**, 537–545 (2017).
 - 35) Ueda, K., Nakajima, T., Yoshikawa, K., Toya, Y., Matsuda, F., and Shimizu, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **126**, 38–43 (2018).
 - 36) Kajihata, S., Matsuda, F., Yoshimi, M., Hayakawa, K., Furusawa, C., Kanda, A., and Shimizu, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 140–144 (2015).
 - 37) Shirai, T., Fujimura, K., Furusawa, C., Nagahisa, K., Shioya, S., and Shimizu, H.: *Microb. Cell Fact.*, **6**, 19 (2007).
 - 38) Shirai, T., Nakato, A., Izutani, N., Nagahisa, K., Shioya, S., Kimura, E., Kawarabayasi, Y., Yamagishi, A., Gojobori, T., and Shimizu, H.: *Metab. Eng.*, **7**, 59–69 (2005).
 - 39) Masuda, A., Toya, Y., and Shimizu, H.: *Bioresour. Technol.*, **245**, 1634–1640 (2017).
 - 40) Wada, K., Toya, Y., Banno, S., Yoshikawa, K., Matsuda, F., and Shimizu, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 177–182 (2017).
 - 41) Okahashi, N., Matsuda, F., Yoshikawa, K., Shirai, T., Matsumoto, Y., Wada, M., and Shimizu, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **114**, 2782–2793 (2017).
 - 42) Hayakawa, K., Kajihata, S., Matsuda, F., and Shimizu, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 532–538 (2015).
 - 43) Hayakawa, K., Matsuda, F., and Shimizu, H.: *Microb. Cell Fact.*, **17**, 82 (2018).
 - 44) Kacser, H. and Burns, J. A.: *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **27**, 65–105 (1973).
 - 45) Small, J. R. and Kacser, H.: *Eur. J. Biochem.*, **213**, 613–624 (1993).
 - 46) Small, J. R. and Kacser, H.: *Eur. J. Biochem.*, **213**, 625–640 (1993).
 - 47) Heijnen, J. J., van Gulik, W., Shimizu, H., and Stephanopoulos, G.: *Metab. Eng.*, **6**, 391–400 (2004).
 - 48) Usui, U., Hirasawa, T., Furusawa, C., Shirai, T., Yamamoto, N., Mori, H., and Shimizu, H.: *Microb. Cell Fact.*, **11**, 87 (2012).
 - 49) Simpson, T., Shimizu, H., and Stephanopoulos, G.: *Biotechnol. Bioeng.*, **58**, 149–153 (1998).
 - 50) Shimizu, H., Tanaka, H., Nakato, A., Nagahisa, K., Kimura, E., and Shioya, S.: *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **25**, 291–298 (2003).
 - 51) Nagai, H., Masuda, A., Toya, Y., Matsuda, F., and Shimizu, H.: *Metab. Eng.*, **47**, 1–9 (2018).
 - 52) Contador, C., Rizk, M. I., Asenjo, J. A., and Liao, J.: *Metab. Eng.*, **11**, 221–233 (2009).
 - 53) Tokuyama, K., Toya, Y., Horinouchi, T., Furusawa, C., Matsuda, F., and Shimizu, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 1542–1551 (2018).