

Title	クラミドモナス・ラインハルディにおける増殖連動型のトリアシルグリセロール生合成経路のデザイン
Sub Title	
Author	斎藤, 沙也香
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2012
Jtitle	生命と情報 No.19 (2012.) ,p.80- 88
JaLC DOI	
Abstract	<p>地球温暖化などの問題を解決する手段としてオイル産生微細藻類による持続可能なオイル産生が注目を集めている。しかしながらオイル産生微細藻類実用化のためには製造コストを下げるという問題を解決しなければならない。</p> <p>本研究では突然変異誘導と代謝工学という2方面からオイル産生藻類の産生効率改善を試みた。ダイジェストでは代謝工学的アプローチについて述べる。生物におけるシミュレーションの方法は多数あるが、本研究ではChlamydomonas reinhardtii (C. reinhardtii)のゲノムスケールモデルiRC1080(Chang et al.,2011)とFlux Balance Analysis(FBA)を利用してin silicoにおける「増殖すると副産物としてTAGを産生してしまうような代謝経路のデザイン」を試みた。FBAはシミュレーションに必要な生化学情報が欠乏している場合でも、代謝ネットワークの化学量論が分かっているならばバイオマス生成最大化などの目的関数を設定することで目的関数を最適化するような細胞内フラックスを求めることが出来る。そのため、様々な生物種を対象に大規模なゲノムスケールモデルを利用した解析が行われている。本研究では目的の代謝経路をデザインするため、まずiRC1080の挙動確認としてChangらの論文で行われていたバイオマス生成必須遺伝子の予測シミュレーションの追従を行った。挙動確認後、バイオマス生成必須遺伝子以外の遺伝子を網羅的に1遺伝子欠損、2遺伝子欠損を行い目的の代謝経路がデザイン可能なか確認した。結果、デザインすることは出来なかった。そこでTAG合成経路ではTAG1molにつきNADHが6mol再酸化されることから、独立栄養条件、混合栄養条件、従属栄養条件の3条件でNADH関連反応をそれぞれフラックスの大きい順に順番に欠損した。結果全ての条件で22～23反応を欠損したところで目的の代謝経路のデザインを行うことが出来た。更に、23反応に関連する遺伝子を網羅的に組み合わせて欠損した結果、5遺伝子欠損で目的の代謝経路のデザインを行えることが分かった。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2012年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000019-0080

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

クラミドモナス・ラインハルディにおける増殖連動型のトリアシルグリセロール生合成経路のデザイン

環境情報学部 4 年

斎藤 沙也香

要旨

地球温暖化などの問題を解決する手段としてオイル産生微細藻類による持続可能なオイル産生が注目を集めている。しかしながらオイル産生微細藻類実用化のためには製造コストを下げるという問題を解決しなければならない。

本研究では突然変異誘導と代謝工学という 2 方面からオイル産生藻類の産生効率改善を試みた。ダイジェストでは代謝工学的アプローチについて述べる。生物におけるシミュレーションの方法は多数あるが、本研究では *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) のゲノムスケールモデル iRC1080 (Chang *et al.*, 2011) と Flux Balance Analysis (FBA) を利用して *in silico* における「増殖すると副産物として TAG を産生してしまうような代謝経路のデザイン」を試みた。FBA はシミュレーションに必要な生化学情報が欠乏している場合でも、代謝ネットワークの化学量論が分かっているならばバイオマス生成最大化などの目的関数を設定することで目的関数を最適化するような細胞内フラックスを求めることが出来る。そのため、様々な生物種を対象に大規模なゲノムスケールモデルを利用した解析が行われている。本研究では目的の代謝経路をデザインするため、まず iRC1080 の挙動確認として Chang らの論文で行われていたバイオマス生成必須遺伝子の予測シミュレーションの追従を行った。挙動確認後、バイオマス生成必須遺伝子以外の遺伝子を網羅的に 1 遺伝子欠損、2 遺伝子欠損を行い目的の代謝経路がデザイン可能なか確認した。結果、デザインすることは出来なかった。そこで TAG 合成経路では TAG 1 mol につき NADH が 6 mol 再酸化されることから、独立栄養条件、混合栄養条件、従属栄養条件の 3 条件で NADH 関連反応をそれぞれフラックスの大きい順に順番に欠損した。結果全ての条件で 22~23 反応を欠損したところで目的の代謝経路のデザインを行うことが出来た。更に、23 反応に関連する遺伝子を網羅的に組み合わせて欠損した結果、5 遺伝子欠損で目的の代謝経路のデザインを行えることが分かった。

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, FBA, Ethanol, Triacylglycerol,

1. 序論

トリアシルグリセロール(triacylglycerol: TAG)は藻類の蓄積する脂質の中でも再生可能な次世代燃料として注目を集めている[1]. しかしながら生産コストが高く実用化には至っていない.

緑藻のモデル生物である*Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*)は、窒素欠乏条件下でTAGを蓄積することが知られているが[2], TAG蓄積と同時に増殖することは出来ない. もし、増殖と同時にTAGを蓄積するような株を得ることが出来れば、連続培養でTAGを生産させることが可能になるため、生産効率を上げることが出来、生産コストを下げる事が可能になる. 増殖しながらTAGを蓄積するような株を得るためには代謝経路の改変が必要であるが、改変方法の1つに、増殖すると副産物として目的産物を産生してしまうような代謝経路の構築が挙げられる[3][4]. このような代謝経路を構築することが出来れば、増殖速度が速まれば速まるほど、最低限蓄積するTAGの量が増加する. つまり、実際に培養した際に増殖速度の速い株を得ることが、TAG蓄積能力が最も高い株を得ることに繋がる.

代謝経路を構築する際に用いられる手法の1つに、代謝フラックス解析が挙げられる[5]. 代謝フラックス解析は、細胞内の代謝が定常状態にあることを仮定して、細胞内の代謝フラックスを予測する手法のことである[5]. 代謝フラックス解析を行う際にしばしば問題となるのが、観測可能な細胞内の反応速度数がフラックスを予測するのに必要な反応速度数よりも少ないという点である[5]. このような場合に有効な手法が、代謝フラックス解析の1種であるフラックスバランス解析(Flux Balance Analysis: FBA)である[5][6][7]. FBAではバイオマス生産の最大化などを目的関数に、その他酸素の取り込み量などの設定すべき条件を設定し、線形計画法を利用して目的関数を最大化もしくは最小化した場合の細胞内代謝フラックス分布を予測する手法である[6][7]. 現在では主要1次代謝経路だけではなく、2次代謝経路まで含まれている大規模なゲノムスケールモデルがいくつかの生物について報告されており[8], *C. reinhardtii*についてもいくつか報告されている[9][10].

本研究では、Changらによって構築された*C. reinhardtii*のゲノムスケールモデル iRC1080 を用いてFBAを行なった[11]. モデルの駆動と設定条件を確認後、増殖すると副産物としてTAGを蓄積してしまうような代謝デザインが可能であるのか検証するため、NADH関連反応をフラックス順に欠損した.

2. 対象と手法

2-1. 本解析に利用した*C. reinhardtii*のゲノムスケールモデル

本研究におけるFBAは全てChangらに構築された*C. reinhardtii*のゲノムスケールモデルiRC1080を用いて行った[11]. iRC1080は2011年春学期まで利用していたモデルiAM303[12]を改良したものである. モデルに含まれている主要な代謝経路を図1に表した.

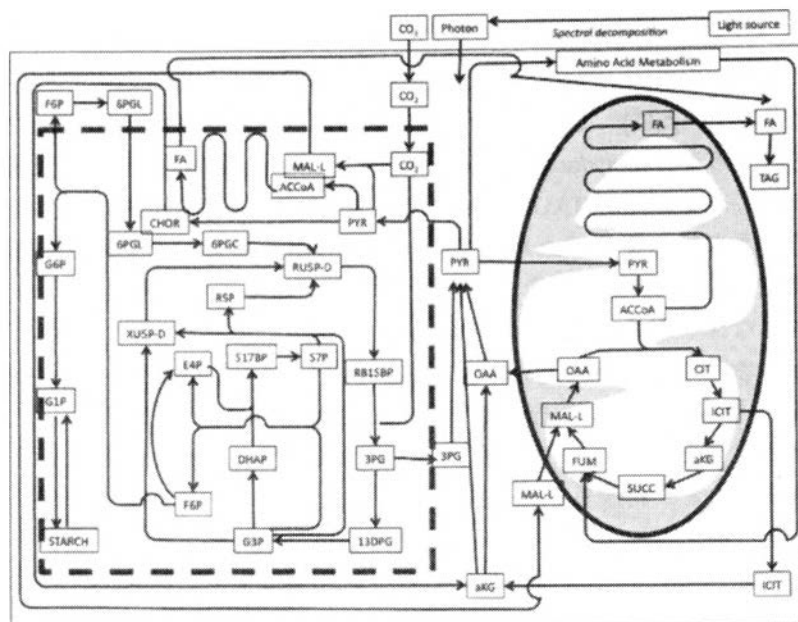


図1 iRC1080に含まれる主要代謝経路

13DPG: 3-Phospho-D-glyceroyl phosphate, 3PG: 3-Phospho-D-glycerate, 6PGL: 6-phospho-D-glucono-1,5-lactone,

6PGC: 6-Phospho-D-gluconate, ACCoA: Acetyl-CoA, aKG: 2-Oxoglutarate, CIT: Citrate,

DHAP: Dihydroxyacetone phosphate, E4P: D-Erythrose 4-phosphate, F6P: beta-D-Fructose 6-phosphate,

FA: Fatty Acids, Fum: Fumarate, G1P: D-Glucose 1-phosphate, G3P: D-glyceraldehyde 3-phosphate,

G6P: D-glyceraldehyde 6-phosphate, ICIT: iso-citrate, MAL-L: L-Malate, OAA: Oxaloacetate,

PEP: Phosphoenolpyruvate, Pi: Phosphate, PPi: Diphosphate, PYR: Pyruvate,

Rb15bp: D-Ribulose 1,5-bisphosphate, Ru5p-D: D-Ribulose 5-phosphate, R5P: alpha-D-Ribose 5-phosphate,

S17BP: Sedoheptulose 1,7-bisphosphate, S7P: Sedoheptulose 7-phosphate, SUCC: Succinate, TAG: Triacylglycerol,

XU5P-D: D-Xylulose 5-phosphate

iAM303とiRC1080では以下の3点に大きな変更があった。1点目は、脂肪酸合成経路やTAG合成経路が含まれていること。2点目は、先行研究から独立栄養、混合栄養、従属栄養の3つの条件におけるバイオマス生成反応式を作り、区別していること。3点目は、先行研究でよく利用されている太陽光や蛍光灯などの12の光源について、光をPhotonとして吸収する反応を加えたことである。また本研究の目標を達成するため、iRC1080にTAGを細胞外に排出する反応を加えた(表2)。

表2 TAG蓄積反応

Reaction Name	Reaction
EX_tag(e)	TAG16018111Z160[e]→
TAGt	TAG16018111Z160[c]→TAG16018111Z160[e]

TAG16018111Z160 : ,Triacylglycerol (16:0/18:1(11Z)/16:0) , [c]: Cytosol, [e]: Extra-organism

iRC1080ではTAGがバイオマス構成物質の1つとして合成されており、バイオマスの構成成分は実験データに基づいて固定されていた。しかし本研究ではバイオマス分に加えてTAGを蓄積する代謝経路をデザインすることを目的としている。このTAGの蓄積フラックスの行き先としては、細胞

外に排出するような反応を加えることで表現した。この加えた反応のEX_tag(e)のフラックスが、本研究における細胞内に蓄積するTAGのフラックスの予測値である。

また、iRC1080ではLactateの排出速度の上限値が0 mmol/gDW/hに固定されておりLactateを排出出来ない状態に拘束されていた。しかしながら遺伝子欠損の先行研究の結果を予測出来るのかシミュレーションする際にLactateの排出を確認する必要があるため、上限値を1000 mmol/gDW/hに変更した。以降本研究におけるiRC1080とは、Changらが構築したモデルに上記2点の変更を加えたモデルとする。また、iRC1080においてはトランスクリプトがGeneとして定義されているため、本研究における遺伝子とはトランスクリプトを指すものとする。

2-2. FBA

C. reinhardtiiの細胞内フラックスは、FBAを利用して算出した。各シミュレーションにおける目的関数と制限条件を次に示した。光条件で動かない反応、暗条件で動かない反応については表3,4にそれぞれ示した。またFBAはMATLAB R2011a for Windows 32bit ver.(The MathWorks Inc., Natick, MA, USA)とCOBRA Toolboxソフトウェアパッケージを使用して実施した。

2-3. 増殖すると副産物としてTAGを産生してしまうような代謝経路のデザイン

TAG合成経路ではTAGを1mol産生するごとに6molのNADHが再酸化される。このことから、NADHを再酸化する反応をフラックスが大きい順に欠損することで目的の代謝経路がデザイン出来るのではないかと考えた。そこで独立栄養条件、混合栄養条件、従属栄養条件の3条件にてNADHを再酸化する反応をリストに入れ目的関数をバイオマス生成最大化に設定してFBAを行い、リスト内のフラックスが1番大きい反応、つまり1番NADHを再酸化している反応を欠損した後、再度FBAを行うというシミュレーションをバイオマスのフラックスが0になるまで続けた。細胞内にてNADHとNADPHのバランスを保つ反応: $\text{NNOR}(\text{nad}[\text{m}] + \text{nadph}[\text{m}] \rightleftharpoons \text{nadh}[\text{m}] + \text{nadp}[\text{m}])$ は今回の目的に不適なので最初から欠損した。

①独立栄養条件におけるシミュレーション

[目的関数]

Biomass Chlamy_auto

[制限条件]

- ・ 光条件: PRISM_solar_litho(太陽光)
- ・ Acetate(ac)取り込み速度: 上限を0 mmol/gDW/hに固定
- ・ 酸素(O₂)取り込み速度: 上限を10 mmol/gDW/hに固定
- ・ starch分解速度: 0.87×10^{-4} mmol/gDW/hに固定[19]
- ・ 光条件で動かない反応のフラックス: 0 mmol/gDW/hに固定

②混合栄養条件におけるシミュレーション

[目的関数]

Biomass Chlamy_mixo

[制限条件]

- ・ 光条件: PRISM_solar_litho(太陽光)
- ・ 酸素(O₂)取り込み速度: 上限を10 mmol/gDW/hに固定
- ・ starch分解速度: 0.87×10^{-4} mmol/gDW/hに固定[19]
- ・ 光条件で動かない反応のフラックス: 0 mmol/gDW/hに固定

③従属栄養条件におけるシミュレーション

[目的関数]

Biomass Chlamy_hetero

[制限条件]

- ・ 光条件：PRISM_solar_litho(太陽光)
- ・ 酸素(O₂)取り込み速度：上限を10 mmol/gDW/hに固定
- ・ CO₂取り込み速度：上限値を0 mmol/gDW/hに固定
- ・ starch分解速度：0.87×10⁻⁴ mmol/gDW/hに固定[19]
- ・ 光条件で動かない反応のフラックス：0 mmol/gDW/hに固定

表3光条件で動かないとされている反応

Reaction Name	Reaction
FBAh	[h]: FDP → DHAP + G3P
G6PADHh	[h]: G6PA + NADP → 6PGL + NADPH + H
G6PBDHh	[h]: G6PB + NADP → 6PGL + NADPH + H
PCHLPR	[h]: PCHLDA + ATP + H ₂ O + H → CHLDA + ADP + Pi
PFKh	[h]: F6P + ATP → FDP + ADP + H

6PGL: 6-phospho-D-glucono-1,5-lactone, CHLDA: Chlorophyllide, DHAP: Dihydroxyacetone Phosphate,

F6P: beta-D-Fructose 6-phosphate, FDP: beta-D-Fructose 1,6-bisphosphate, G3P: D-glyceraldehyde 3-phosphate,

G6PA: alpha-D-Glucose 6-phosphate, G6PB: beta-D-Glucose 6-phosphate, Pi: Phosphate,

PCHLDA: Protochlorophyllide alpha, [h]: Chloroplast

表4暗条件で動かないとされている反応

Reaction Name	Reaction
ATPSh	ADP[h] + 4H[u] + Pi[h] → ATP[h] + 3H[h] + H ₂ O[u]
GAPDH(nadp)hi	[h]: 13DPG + H + NADPH → G3P + NADP + Pi
GLPThi	[h]: ATP + G1P → ADPGLC + PPi
IDPh	[h]: H ₂ O + PPi → 2Pi
MDH(nadp)hi	[h]: H + NADPH + OAA → MAL-L + NADP
MDHC(nadp)hr	[h]: MAL-L + NADP <=> CO ₂ + NADPH + PYR
PPDKh	[h]: ATP + Pi + PYR → AMP + 2H + PEP + PPi
PRUK	[h]: ATP + Ru5p-D → ADP + H + Rb15bp
RBCh	[h]: O ₂ + Rb15bp → 2PGLYC + 3PG + 2H
RBPCh	[h]: CO ₂ + H ₂ O + Rb15bp → 2 3PG + 2H
SBP	[h]: H ₂ O + S17BP → Pi + S7P

13DPG: 3-Phospho-D-glyceroyl phosphate, 2PGLYC: 2-Phosphoglycolate, 3PG: 3-Phospho-D-glycerate,

ADPGLC: ADPglucose, G1P: D-Glucose 1-phosphate, G3P: D-glyceraldehyde 3-phosphate, MAL-L: L-Malate,

OAA: Oxaloacetate, PEP: Phosphoenolpyruvate, Pi: Phosphate, PPi: Diphosphate, PYR: Pyruvate,

Rb15bp: D-Ribulose 1,5-bisphosphate, Ru5p-D: D-Ribulose 5-phosphate, S17BP: Sedoheptulose 1,7-bisphosphate, S7P: Sedoheptulose 7-phosphate, [h]: Chloroplast, [u]: Thylakoid Lumen

3. 結果と考察

独立栄養条件でのシミュレーション結果を表5(a)に、混合栄養条件でのシミュレーション結果を表5(b)に、従属栄養条件でのシミュレーション結果を表5(c)に示した

表5 NADH関連反応の欠損結果

(a) 独立栄養条件におけるNADH関連反応の欠損結果

Deficiency reactions	Biomass(1/h)	TAG(mmol/gDW/h)	TAG(C-mmol/C-mmol)
~18	0.146	0	0
19	0.143	0	0
20	0.142	0	0
21	0.139	0	0
22	0.139	0	0
23~30	0.0758	0.0616	0.00977

(b) 混合栄養条件におけるNADH関連反応の欠損結果

Deficiency reactions	Biomass (1/h)	TAG(mmol/gDW/h)	TAG(C-mmol/C-mmol)
~11	0.378	0	0
12	0.272	0	0
13	0.242	0	0
14~19	0.242	0	0
20~21	0.238	0	0
22	0.231	0	0
23	0.136	0.114	0.498
24	0.132	0.111	0.498
25	0.129	0.109	0.498
26	0.127	0.106	0.498
27	0.124	0.104	0.498
28	0.121	0.102	0.498
29	0.119	0.100	0.498
30	0.116	0.098	0.498

(c) 従属栄養条件におけるNADH関連反応の欠損結果

Deficiency reactions	Biomass (1/h)	TAG(mmol/gDW/h)	TAG(C-mmol/C-mmol)
~7	0.474	0	0
8	0.469	0	0
9	0.330	0	0
10~13	0.289	0	0
14~18	0.289	0	0
19	0.287	0	0
20	0.281	0	0
21	0.234	0	0
22	0.211	0	0
23	0.134	0.110	0.568
24	0.123	0.100	0.568
25	0.113	0.093	0.569
26	0.105	0.086	0.569
27	0.098	0.080	0.569
28	0.092	0.075	0.569
29	0.086	0.071	0.569
30	0.081	0.067	0.569

今回のシミュレーションでは、3条件全てで増殖すると副産物としてTAGを産生してしまうような株を予測することが出来た。これは、NADH再酸化反応をフラックスの大きい順に欠損したことによりNADHの再酸化をTAG生合成反応にて行うことがBiomassを生成する上で最も効率がよく

なったためと考えられる。3条件とも23反応欠損して初めて増殖するとTAGを産生するような株を得ることが出来たが、欠損する反応は各条件によって異なっていた。欠損した反応数とBiomassのフラックス、またTAGの収率から判断すると、従属栄養条件で培養23反応欠損した場合が最も有用であると考えられる。

さて、従属栄養条件にて欠損した23反応を司る遺伝子の数は16であったが、その中の最低いくつかの遺伝子を欠損すると増殖すると副産物としてTAGを産生するような代謝デザインを行うことが出来るのかを検証した。NADH関連反応欠損の際はNNOR($\text{nad}[\text{m}] + \text{nadph}[\text{m}] \rightleftharpoons \text{nadh}[\text{m}] + \text{nadp}[\text{m}]$)を最初から欠損していたが、検証の際は行わなかった。結果、5遺伝子の欠損で増殖すると副産物としてTAGを産生するような株を得ることが出来た。その場合欠損した遺伝子と司る反応を表6に、解空間を図2に載せた。

表6欠損した遺伝子と関連反応

acald: Acetaldehyde, accoa: Acetyl-CoA, btal: Butanal, btcoa: Butanoyl-CoA, glyald: D-Glyceraldehyde,
glyc: Glycerol, [c] cytosol, [m]mitochondria.[h] Chloroplast

Genes (transcripts)	Reactions
CRv4_Au5.s16.g6435.t1	$\text{acald}[\text{c}] + \text{h}[\text{c}] + \text{nadh}[\text{c}] \rightarrow \text{etoh}[\text{c}] + \text{nad}[\text{c}]$ $\text{acald}[\text{m}] + \text{h}[\text{m}] + \text{nadh}[\text{m}] \rightarrow \text{etoh}[\text{m}] + \text{nad}[\text{m}]$
CRv4_Au5.s16.g6436.t1	$\text{accoa}[\text{c}] + 2 \text{h}[\text{c}] + 2 \text{nadh}[\text{c}] \rightarrow \text{coa}[\text{c}] + \text{etoh}[\text{c}] + 2 \text{nad}[\text{c}]$ $\text{accoa}[\text{m}] + 2 \text{h}[\text{m}] + 2 \text{nadh}[\text{m}] \rightarrow \text{coa}[\text{m}] + \text{etoh}[\text{m}] + 2 \text{nad}[\text{m}]$ $\text{acald}[\text{c}] + \text{h}[\text{c}] + \text{nadh}[\text{c}] \rightarrow \text{etoh}[\text{c}] + \text{nad}[\text{c}]$ $\text{acald}[\text{m}] + \text{h}[\text{m}] + \text{nadh}[\text{m}] \rightarrow \text{etoh}[\text{m}] + \text{nad}[\text{m}]$
CRv4_Au5.s20.g8212.t1	$\text{btal}[\text{c}] + \text{coa}[\text{c}] + \text{nad}[\text{c}] \rightarrow \text{btcoa}[\text{c}] + \text{h}[\text{c}] + \text{nadh}[\text{c}]$ $\text{btal}[\text{h}] + \text{coa}[\text{h}] + \text{nad}[\text{h}] \rightarrow \text{btcoa}[\text{h}] + \text{h}[\text{h}] + \text{nadh}[\text{h}]$ $\text{acald}[\text{c}] + \text{coa}[\text{c}] + \text{nad}[\text{c}] \rightarrow \text{accoa}[\text{c}] + \text{h}[\text{c}] + \text{nadh}[\text{c}]$ $\text{acald}[\text{h}] + \text{coa}[\text{h}] + \text{nad}[\text{h}] \rightarrow \text{accoa}[\text{h}] + \text{h}[\text{h}] + \text{nadh}[\text{h}]$ $\text{accoa}[\text{c}] + 2 \text{h}[\text{c}] + 2 \text{nadh}[\text{c}] \rightarrow \text{coa}[\text{c}] + \text{etoh}[\text{c}] + 2 \text{nad}[\text{c}]$ $\text{accoa}[\text{m}] + 2 \text{h}[\text{m}] + 2 \text{nadh}[\text{m}] \rightarrow \text{coa}[\text{m}] + \text{etoh}[\text{m}] + 2 \text{nad}[\text{m}]$ $\text{acald}[\text{c}] + \text{h}[\text{c}] + \text{nadh}[\text{c}] \rightarrow \text{etoh}[\text{c}] + \text{nad}[\text{c}]$ $\text{acald}[\text{m}] + \text{h}[\text{m}] + \text{nadh}[\text{m}] \rightarrow \text{etoh}[\text{m}] + \text{nad}[\text{m}]$
CRv4_Au5.s2.g9414.t1	$\text{acald}[\text{h}] + \text{h}[\text{h}] + \text{nadph}[\text{h}] \rightarrow \text{etoh}[\text{h}] + \text{nadp}[\text{h}]$ $\text{acald}[\text{c}] + \text{h}[\text{c}] + \text{nadph}[\text{c}] \rightarrow \text{etoh}[\text{c}] + \text{nadp}[\text{c}]$ $\text{glyald}[\text{c}] + \text{h}[\text{c}] + \text{nadh}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{glyc}[\text{c}] + \text{nad}[\text{c}]$ $\text{glyald}[\text{c}] + \text{h}[\text{c}] + \text{nadph}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{glyc}[\text{c}] + \text{nadp}[\text{c}]$
CRv4_Au5.s9.g15693.t1	$\text{h}[\text{c}] + \text{nadh}[\text{c}] + \text{no3}[\text{c}] \rightarrow \text{h2o}[\text{c}] + \text{nad}[\text{c}] + \text{no2}[\text{c}]$

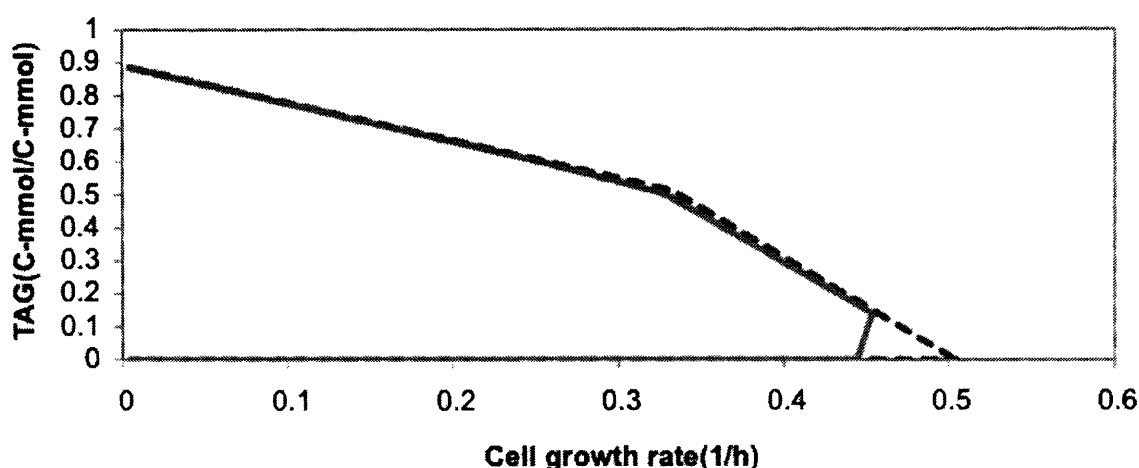


図2-5 遺伝子欠損した場合の解空間

縦軸はTAGの収率を $(\text{TAGのフラックス} \times \text{TAGの炭素数}(53)) \div (\text{細胞内に取り込んだ炭素数})$ という式から算出し、横軸はcell growth rateを表した。黒の点線で囲まれた部分で野生株の解空間を、赤の実線で囲まれた部分で欠損株の解空間を示した。

これら遺伝子を欠損した場合、従属栄養条件では目的の株を得ることが出来なかったが、混合栄養条件では目的の株を得ることが出来た。

4. 結論

本研究は、オイル産生藻類によるオイル生成がコストの問題から実用化されないという課題を、オイル産生能力を向上させることで解決することを目標に研究を行った。結果22～23反応欠損することで目的の株を得ることは出来たが、この23反応を欠損するためには19～20の遺伝子を欠損することが必要であった。しかし、今回はそのうちの5遺伝子を欠損することで目的の株を得ることが出来た。5遺伝子欠損を行うことはかなり困難であるが、不可能なことではない。今後は実験的にこれらの遺伝子を欠損することで変異体を作成し増殖に連動してTAGを産生するのかを調べ、連動が確認できれば大幅なオイル産生能力の向上、そして生産効率の改善が期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたりアドバイザーである戸谷吉博博士には、お忙しい中大阪からの遠隔にも関わらず、研究の内容や方向性について熱心にご指導頂きました。また藻グループの皆様、TTCKの皆様、研究会の同期の皆様、11'バイオキャンパーの皆様、o308のメンバーには多くの刺激と楽しい時間を頂きました。またここには書ききれませんが、両親を始めとするたくさんの皆様の支えがあったお陰でここまでたどり着くことが出来ました。この場を借りてお礼申し上げます。最後になりますが、このような素晴らしい環境を与えてくださった富田勝教授に深くお礼申し上げます。

参考文献

- [1] Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. and Darzins, A. (2008) Microbial triacylglycerols as feedstocks for Biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, **54**,621-639.
- [2] Weers, M. M. P., and Gulati, D. R. (1997) Growth and reproduction of *Daphnia galeata* in response to changes in fatty acids, phosphorus, and nitrogen in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Limnology and Oceanography*, **72**(7),1584-1589.
- [3] Feist, M. A., Zielinski, C. D., Orth, D. J., Schellenberger, J., Harggard, J. M., and Palsson, B. Ø. (2010) Model-driven evaluation of the production potential for growth-coupled products of *Escherichia coli*.

Metabolic Engineering, **12**, 173-186.

[4] Alper, H., Jin, Y., Moxley, J. F., and Stephanopoulos, G. (2005) Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, **7** 155-164.

[5] 清水浩(2002), バイオプロセスシステムエンジニアリング, シーエムシー出版, 158-166.

[6] Edwards, S. J., Ibarra, U. R., and Palsson, B. Ø. (2001) In silico predicts of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nature Biotechnology*, **19**, 125-130.

[7] Stephanopoulos, N. G., Aristidou, A. A., and Nielsen, J. (2002) 代謝工学 —原理と方法論— 清水浩, 塩谷 捨明 訳. 学校法人 東京電機大学, 1-11.

[8] Orth, J. D., Thiele, I., and Palsson, B. Ø. (2008) What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology*, **3**, 245-248.

[9] Boyle, N. R., and Morgan, J. A. (2009) Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Systems Biology*, **3**, 4.

[10] Manichaikul, A., Ghamsari, L., Hom, E. F. Y., Lin, C., Murray, R. R., Chang, R. L., Balaji, S., Hao, T., Shen, Y., Chavali, A. K., et al., (2009) Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. *Nature Methods*, **6**(8), 589-592.

[11] Chang, R. L., Ghamsari, L., Manichaikul, A., Hom, E. F. Y., Balaji, S., Fu, W., Shen, Y., Hao, T., Palsson, B. Ø., Salehi-Ashtiani, K., and Papin, J. A. (2011) Metabolic network reconstruction of *Chlamydomonas* offers insight into light-driven algal metabolism. *Molecular Systems Biology*, **7**:518, 1-13.

[12] Manichaikul, A., Ghamsari, L., Hom, E. F. Y., Lin, C., Murray, R. R., Chang, R. L., Balaji, S., Hao, T., Shen, Y. and Chacali, A. K., et al., (2009) Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. *Nature Methods*, **6**, 589-592.