

[招待論文：総説・レビュー論文]

数理モデルを基盤とした微生物代謝システムの設計・評価の方法

Rational Design and Evaluation Methods of Microbial Metabolic System Based on Mathematical Models

戸谷 吉博

大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻准教授

Yoshihiro Toya

Associate Professor, Department of Bioinformatic Engineering, Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University

Correspondence to: ytoya@ist.osaka-u.ac.jp

Abstract: 持続可能な社会の実現に向けて、微生物の代謝システムを利用した有用物質生産が注目されている。原料から目的物質への変換効率を高めるには、代謝システムを合理的に設計し、それに基づいて現実の細胞を育種する代謝工学の取り組みが必須であり、なかでも数理モデルを利用した研究は代謝工学の中心的な役割を担っている。本総説では、数理モデルに基づいて代謝システムを設計・評価するための手法について、最近の技術進歩や応用事例をまとめ、今後の微生物を利用したモノづくりにおける代謝工学研究の展望を述べた。

Towards a sustainable society, bio-productions of useful chemicals using microbial metabolism are attracting attention. To increase the conversion efficiency of a substrate to a target chemical, rational engineering the metabolic system based on available information is important. Although there are many approaches in metabolic engineering, model-based approaches have been promising ways for enhancing the productivities. In this review, I summarized recent technical progresses and remarkable applications based on model-based methods for designing and evaluating the metabolic systems. Furthermore, I discuss future perspective of metabolic engineering for microbial bio-productions.

Keywords: 代謝工学、微生物、バイオプロダクション、シミュレーション
metabolic engineering, microorganism, bio-production, *in silico* simulation

1 緒言

化石資源の枯渇や地球環境の汚染が社会問題化する中、再生可能なバイオマス資源を原料としたモノづくりは、石油化学プロセスによる物質生産を脱却し、持続可能な開発目標 (Sustainable Development Goals: SDGs) の実現に向けた取り組みとして注目されている。このようなバイオテクノロジーによるモノづくりの主役は、目に見えない微生物であり、様々な産業利用が進められている。微生物は古くから醗酵食品の生産に使われており、今日では医薬品、食品添加物、燃料、プラスチックや繊維など、様々な有用化合物の生産に使われている。バイオプロセスによる生産をさらに普及させるには、生産可能な化合物の種類を拡げることに加えて、原料から目的物質への変換効率の向上が重要な課題である。

微生物は細胞内に糖などの栄養源を取り込んだ後、代謝と呼ばれる多段階の化学反応によってエネルギーを生み出し、これを駆動力に使うことで栄養源を分解して得た低分子化合物から自分自身を再構成し、増殖している。微生物が原料を様々な有用物質へと変換するプロセスも、この代謝システムを利用することで実現している。代謝のもともとの役割は我々の望む化合物の生産ではなく増殖であるため、その化合物の生産速度や収率は低いことが多い。そのため、実用化には微生物の代謝システムを改変し、目的物質の生産に適した状態に最適化する取り組みが不可欠である。代謝経路は酵素によって触媒される多数の反応からなる複雑なネットワークを形成しており、直感的に改変することが難しい場合が多い。今世紀に入ってからゲノム解析をはじめ網羅的解析技術が進展し、酵素の特性に関する知見もデータベースに集約されている。遺伝子組換え技術が発展し、狙い通りに細胞の設計図を書き換えられるようになった今、利用可能な情報に基づいて、代謝を合理的に改変しようという代謝工学の研究が、益々重要になってきている (Shimizu and Toya, 2021)。

代謝工学には様々なアプローチがあるが、なかでもモデルベースの研究は中心的な役割を担っている。目的や対象によって様々な方法があり、表1にモデルの種類と目的に対する解析手法、それぞれの特徴や主な用途をまとめた。代謝システムのモデルは、静的モデルと動的モデルに分類することがで

表 1 数理モデルベースの代謝経路の解析手法

解析手法	モデル	用途	特徴と主な用途	主なソフトウェア
フラックスバランクス解析 (FBA)	静的	設計	線形計画法を用いて目的関数を最大化/最小化するフラックス分布を計算する。ゲノムワイドな大規模な代謝経路についても高速に計算できる。 ・ 増殖連動型生産のための代謝経路の設計 ・ 新規化合物の合成経路の設計	COBRA Toolbox v3.0 (Heirendt et al., 2019) など
エレメンタリーモード解析 (EMA)	静的	設計	代謝経路を物質収支を満たす最小の反応セットに分解する。計算にメモリを多く必要とするため、中枢代謝経路のみを対象とすることが多い。 ・ 増殖連動・増殖非連動型生産のための代謝経路の設計 ・ 代謝経路の頑健性など特徴の解析	MetaTool 5.0 (von Kamp and Schuster, 2006) など
¹³ C-代謝フラックス解析 (¹³ C-MFA)	静的	評価	¹³ C 標識基質で細胞を培養し、質量分析計で測定した代謝物質の標識パターンを説明可能なフラックス分布を、炭素原子の移動を記述したモデルを使って推定する。中枢代謝経路のみを対象とすることが多い。 ・ 代謝経路における各反応の実際の速度を評価 ・ 補酵素の合成生産量・消費量を評価	OpenMebius (Kajihata et al., 2014) OpenFLUX2 (Shupletsov et al., 2014) など
代謝制御解析 (MCA)	動的	設計	動的モデルを用いて、各酵素活性の変化が代謝経路全体のフラックスの変化に及ぼす影響などを数値化する。代謝経路の一部のみを対象とすることが多い。 ・ 経路中の律速点を予測し、生産速度向上の改変戦略を提案	E-Cell 3 (Takahashi et al., 2004) など
<i>in vitro</i> 酵素 V_{max} 推定	動的	評価	細胞粗抽出液を用いて <i>in vitro</i> で反応を駆動し、代謝物質濃度の時系列データを取得する。実験データを説明するように動的モデルに含まれる V_{max} パラメータの値を推定する。代謝経路の一部のみを対象とする。 ・ 代謝経路における各反応の最大反応速度を評価	In house プログラム MATLAB (Kitamura et al., 2021)

きる。静的モデルは反応の化学量論と可逆性にのみ着目し、代数方程式で記述された時間発展を考えないモデルである。一方、動的モデルは化学量論に加えて代謝物質の蓄積量や酵素反応の速度論が考慮されており、微分方程式で記述された時間発展が予測可能なモデルである。それぞれのモデルを使った解析では得意・不得意があり、モデルを設計に使うか、現実の細胞の評価に使うのかによっても解析方法が変わってくる。本総説では、これらの手法について技術的な進歩や応用事例をまとめ、今後の代謝工学研究の展望について考えたい。

2 静的モデルを使った代謝経路の設計

2.1 ゲノムスケール代謝モデルとフラックスバランス解析

生物のゲノムから代謝経路の情報が明らかになり、反応のリストを取得することができるようになった。反応の化学量論から構成されるゲノムワイドな静的モデルが構築されている。このような大規模なモデルは自由度が高いことが特徴である。静的モデルによる解析では、目的関数を設定して線形計画法により代謝の流れ（フラックス分布）をシミュレーションするフラックスバランス解析（FBA）がよく使われている。細胞の増殖速度の最大化を目的関数に設定してシミュレーションを行うことで、遺伝子破壊が代謝に及ぼす影響を予測することができる。

FBAによるシミュレーションは、有用物質生産のための菌株の代謝経路の設計にも用いられている。網羅的に遺伝子を破壊した条件を探索し、増殖最大時に目的物質を生産する遺伝子破壊の組み合わせを探索する。図1に静的モデルを利用した代謝経路設計の概念図を示した。この図では、横軸に増殖速度、縦軸に目的物質生産を取った場合における目的物質生産の実現可能範囲を示している。多くの物質生産では図1Aの灰色で示した領域のように増殖と生産の間にトレードオフの関係が見られるが、遺伝子破壊により代謝を改変することで図1Bに灰色で示したような右側が凸形状の解空間を得ることができる。この解空間においては、細胞は増殖するために副産物として目的物質を生産しなくてはならないことが分かる。このような設計戦略により、大腸菌やシアノバクテリアなど様々な宿主を対象に色々な化合物を目的物質として

生産性向上が報告されている (Tokuyama et al., 2014; Yoshikawa et al., 2017)。

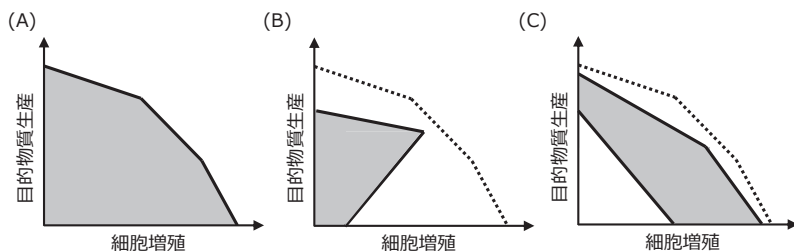


図1 代謝フラックスの解空間を指標とした経路設計の概念図

(A) 多くの目的物質について見られる細胞増殖に対する目的物質生産の実現可能範囲、(B) 増殖連動型の生産に適した解空間、(C) 増殖非連動型の生産に適した解空間。灰色に塗りつぶした領域が実現可能範囲を表す。

2.2 増殖連動型の代謝設計と指向性進化

FBA を使った遺伝子破壊による代謝設計では数多くの成功例が報告されているが、シミュレーションで設計した通りの性能を発揮できている例は少ない。現実とシミュレーションの不一致は、モデルの抽象化が原因の一つである。すなわち、静的モデルでは反応の酵素量や酵素の性質が考慮されていないため、全ての反応が自由に動く仕様になっている。一方、実際の反応のフラックスは、酵素量や基質との親和性、アロステリック阻害によって制限されている。そのため、現実の細胞は、FBA で予測された理想的な代謝状態を実現することができず、期待していた性能が発揮されない。

近年、この理想と現実の不一致を指向性進化によって打ち破る研究が注目されている。FBA で増殖連動型に設計された菌株は、増殖すればするほど目的物質も作るという代謝経路になっている。細胞は増殖を繰り返すうちに変異が生じるため、継代培養を繰り返すうちに、増殖速度が改善した変異体が生じると、集団の中で大多数になっていく。この変異体では、反応に課されていたフラックスの制限が解消され、FBA で予測されていた理想的な代謝状態が実現されるという仕掛けである。Tokuyama ら (2018) は、大腸菌のグリセロールからのコハク酸生産に FBA の設計を応用し、増殖連動型の代謝設

計と指向性進化の効果を実証した。まず初めに FBA の設計通りに 5 つの遺伝子を欠失した大腸菌は、野生株よりは目的物質のコハク酸を生産するものの、その収率は予測からは程遠いものであった。この親株を独立 5 系統の継代培養を繰り返すことで、約 100 世代後にはいずれの系統でも増殖速度が向上し、驚くべきことに単離した進化株のコハク酸の生産は、FBA で予測されていた理想的な収率に到達した。この研究では、さらに進化株のゲノムリシーケンシングにより、独立に進化した 5 株に共通するホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの変異を同定した。この変異によりアスパラギン酸に対する阻害が解除されたことで、フラックスの障壁を取り払い理想的な代謝状態を実現したメカニズムを明らかにした。

最近では、物質生産を目的とした研究だけではなく、特定の代謝反応を駆動させるという目的にも FBA を利用した増殖連動型の設計と指向性進化実験が用いられている。合成生物学的に人工的な代謝経路を設計して、細胞内で働かせようという試みも行われている。このような研究において、実装した人工経路が細胞内で上手く働かないことがある。そこで、導入した人工的な代謝経路を使わなければ生育できない様に宿主の代謝経路を遺伝子破壊により改変し、指向性進化によって標的の代謝経路のフラックスが増加した進化株を獲得することができる。このような方法によって、メタノールを炭素源として利用可能な大腸菌 (Keller et al., 2020)、二酸化炭素だけを炭素源としてカルビン回路で固定し生育する大腸菌が育種されている (Gleizer et al., 2019)。

2.3 エレメンタリーモード解析に基づく増殖非連動型の代謝設計

FBA による設計は細胞増殖の最大化を目的関数に用いるため、増殖と連動した物質生産が対象となる。一方で、実際のモノづくりでは、増殖フェーズと生産フェーズを分離した増殖非連動型のプロセスもよく用いられるため、このような増殖非連動型の生産に適した代謝設計手法も求められている。静的モデルを使った解析手法の一つに、エレメンタリーモード解析 (EMA) がある。EMA は、代謝経路を物質収支を満たす最小の反応セット (EMs) に分解する手法である。Trinh ら (2008) は、遺伝子破壊により、目的物質を作らな

い EMs をすべて取り除くことで、取り込んだ物質を目的物質として排出することでしか物質収支を満たせない代謝経路を設計し、大腸菌のエタノール生産を例に実証している。

EMs を指標として、増殖連動型のフラックスの解空間を設計する方法が開発された (Toya et al., 2015)。実現可能なフラックス分布は EMs の線形和で表されるという特性を利用し、解空間中の削除領域を設定し、その中に含まれる EMs を全て削除するための遺伝子破壊を計算することで解空間の形を自在に変更するアルゴリズムを開発した。増殖非連動型の物質生産においては、図 1C のように解空間の左側が高くなるような解空間を設計することが望ましい。この解空間となる代謝経路では、FBA の時とは反対に、増殖速度を抑制すれば抑制するほど目的物質を排出するようになる。実際に大腸菌のコハク酸生産を例にこの設計を行い、予測された遺伝子破壊を施した菌株では、増殖停止期におけるコハク酸の収率が 2.4 から 2.6 倍に増加したことが確認された (Toya and Shimizu, 2022)。

3 静的モデルを使った代謝フラックスの評価

3.1 ^{13}C -代謝フラックス解析の概要と技術的な進歩

ここまでは実験データを使うことなく代謝経路を設計する方法を述べてきた。代謝工学では、実際の細胞の代謝状態を観察することも重要である。代謝状態を評価する方法として、中間代謝物質や酵素の含量を測定するメタボロミクスやプロテオミクスのアプローチがあるが、本稿では実際の活動を表すフラックスを評価するための ^{13}C -代謝フラックス解析 (^{13}C -MFA) に焦点を当て、重要な技術革新に触れながら、フラックス分布の情報が何に役立つのかを説明する。

一般的な ^{13}C -MFA の流れを説明する。細胞内のフラックス分布を求めるには、まずは測定可能な代謝経路への流入 (基質の消費) と流出 (増殖と代謝物質の生産速度) のフラックスを測定する。多くの場合、代謝経路の自由度が高いため、この情報だけではフラックス分布は一意に決まらない。そこで基質が代謝される経路によって、骨格炭素原子の移動が異なることを利用する。つまり ^{13}C 標識基質を用いて細胞を培養すると、フラックス分布の情報は代

代謝物質の標識パターンに記録される。代謝物質の標識パターンは質量分析計を用いて測定することができる。そこで、反応による炭素原子の移動を考慮したモデルを構築し、フラックス分布を入力として代謝物質の標識パターンを予測する。実測した代謝物質の標識パターンとモデルから計算される標識パターンの残差二乗和が最小になるようにフラックス分布を最適化する (Shimizu, 2004)。

^{13}C -MFA の技術革新の1つは、反応による炭素原子の移動を考慮したモデルリングの方法である。従来は、代謝物質のアイソトポマーの存在量をベクトル表記する方法が用いられてきた。この方法は複数の基質が統合する反応や回路を形成する反応が代謝経路に含まれると、アイソトポマーのベクトルが代数方程式の展開では求まらず、多大な計算コストを生む要因となっていた。Antoniewicz ら (2007) が開発した Elementary Metabolite Units は、この問題を回避した同位体表記方法である。従来の非線形方程式を線形方程式として記述することで、フラックス分布から代謝物質の標識パターンを計算する速度が劇的に改善された。

2つ目の技術革新は推定されたフラックスの統計的評価方法についてである。従来は、実測した代謝物質の標識パターンとフラックスから計算した標識パターンに違いがないことを χ^2 検定で示すことにより、妥当性が確認されてきた。この評価は推定したフラックスが実測したラベルパターンを矛盾なく説明していることを示しているに過ぎない。極論を言えば、非標識の基質を用いて実験を行って ^{13}C -MFA を実施した場合、いかなるフラックス分布でも χ^2 検定を通過するはずである。最近では、どの程度のフラックスの範囲であれば、実測した代謝物質の標識パターンを説明できているのかを 95% 信頼区間として評価する方法が確立している (Antoniewicz et al., 2006)。

3つ目の技術革新は、精度よくフラックスを推定するための実験計画についてである。推定したフラックスに基づいて考察を行うには、信頼区間が狭い幅として推定されることが望ましい。信頼区間の幅は、答えとなるフラックスと炭素源の標識パターンによって決まる。事前にフラックス分布に当たりをつけておき、様々な標識パターンの炭素源について仮想実験を行うことで、狭い幅の信頼区間としてフラックスを推定するために適した炭素源の標

識パターンを選ぶことができる。また、グルコース以外の炭素源についても¹³C-MFA が可能になっており、グリセロールを炭素源とした場合に、フラックスを精度よく推定するための標識方法も開発されている (Toya et al., 2018)。

3.2 推定したフラックス分布に基づく代謝研究

フラックス分布を見ることで、代謝経路のそれぞれの反応が、実際の細胞内でどのくらい働いているかを俯瞰することができる。そこで、異なる条件における細胞のフラックス分布を比較することで、生物の代謝システムが有する調節メカニズムが調べられてきた。例えば、野生株と遺伝子破壊株を比較することで、細胞はどのようにして遺伝子破壊により遮断された代謝経路を迂回して生き延びるのか、また摂動に対してシステムを安定に維持するための調節メカニズムを炙り出すことができる (Ishii et al., 2007)。また、フラックス分布の比較から、代謝に影響を及ぼす化合物の作用点を絞り込む材料としても有用である。Kitamura ら (2019) は、大腸菌を有毒なフェノール存在下に晒した際のフラックス分布の変化から、フェノールが代謝経路のどの反応に作用しているのかを突き止めることに成功した。

有用物質を生産する菌株の育種においても、フラックスを調べることが目的物質の生産性を向上させるための戦略の手掛かりとして利用されている。特に、目的物質の生合成に補酵素を必要とする場合には、これらの補酵素が代謝経路のどの反応で再生されているのかを理解する上で役立っている。Wada ら (2017) は、大腸菌のメバロン酸生産株において、メバロン酸の合成に使われる還元力 NADPH が中枢代謝経路のどの反応で供給されているのか明らかにした。また、先に説明した FBA を使って、理想的なフラックス分布を計算することができる。理想と現実のフラックス分布を比較することで、生産性を強化するにはどの反応のフラックスを変化させればよいのか、改変の指針を与えることができた。

4 動的モデルを使った酵素 V_{\max} の推定と律速段階の同定

前節で取り上げた¹³C-MFA を行うことで、実際の細胞内で代謝がどのよう

に働いているかを知ることができるが、なぜそのフラックスになっているのか原因を突き止めるのは容易ではない。極端な例を考えてみる。図2Aに示す r_1 から r_4 の一本道の経路があったとする。この場合、推定されるフラックスは各中間代謝物質の物質収支を満たさなくてはならないため、全ての反応で同じ値になってしまい、どの反応が重要かはフラックスの情報だけでは分からない。このような一本道の代謝経路のフラックスの値は経路中で最も遅い反応によって決まっており、この反応が律速段階である。有用物質生産の研究では経路全体のフラックスを増加させたいことが多いため、経路中の律速段階を特定して、この酵素の発現量を増加させる改変が行われる。どの酵素反応が律速段階となっているのか、各酵素の V_{\max} が律速段階を同定するための手掛かりとなる。フラックスと V_{\max} の関係を図2Aに示す。 V_{\max} はその名の通り、各反応のフラックスが大きくなる余地を表わしており、フラックスと同じ単位であり直接比較することができる。 V_{\max} がフラックスに近い場合、その反応が律速段階となっている可能性が高い。ただし、酵素と基質の親和性なども影響するため、律速段階を特定するには、厳密には後述する代謝制御解析での評価が必要となる。

酵素 V_{\max} の測定は*in vitro*の反応系で古くから行われてきた。吸光度としてモニタリング可能なNAD(P)Hの消費・生産を伴う酵素反応をカップリングして計測することが多い。中枢代謝経路の重要な酵素全てについて、酵素活性を測定した研究も報告されている(Peng et al., 2004)。しかし、従来法による測定は、それぞれの酵素について異なる反応系を用意する必要があるため、とても骨の折れる実験である。プロテオームによって酵素量を網羅的に測定すればよいのではないかと思われるかも知れないが、 V_{\max} は酵素量に回転数 k_{cat} を掛けた値であるため、酵素量とフラックスの値を直接比較することはできない。仮に全ての反応の k_{cat} が分かっていたとしても、タンパク質のリン酸化など、翻訳後修飾の影響がある場合は、正確な比較が困難である。

近年、細胞から抽出した粗酵素液を用いて、*in vitro*の反応系で一連の代謝経路を駆動し、経路中の酵素の V_{\max} を一斉に推定する方法が開発された(Kitamura et al., 2021)。この方法の概要を図2Bに示す。粗酵素液と基質を混ぜて反応を開始させた後、時系列にサンプリングを行い、代謝物質の濃度

のタイムコースデータを取得する。この代謝経路の速度論モデルについて、 V_{\max} のパラメータを未知数として扱い、実測した時系列データを説明するように最適化を実施する。あらかじめ代謝経路の速度論モデルが構築されていることが前提となるが、一度の実験で、複数酵素の V_{\max} を同時に推定することができる。この方法は、*in vivo* ではなく *in vitro* で実験を行うため、サンプリングや分析の前処理が容易であることもメリットである。また、 V_{\max} の推定に用いた動的モデルを用いることで、代謝制御解析 (MCA) を実行することも可能である。MCA では、各酵素の V_{\max} の値を微小変化させた際に代謝経路のフラックスがどれだけ変化するかを計算することで、それぞれの酵素が代謝経路全体のフラックスに及ぼす寄与を評価することができる。Kitamura ら (2021) は、増殖停止期の大腸菌について解糖系の律速段階を同定し、この酵素を過剰発現することで、解糖系のフラックスが増加したことを実証した。

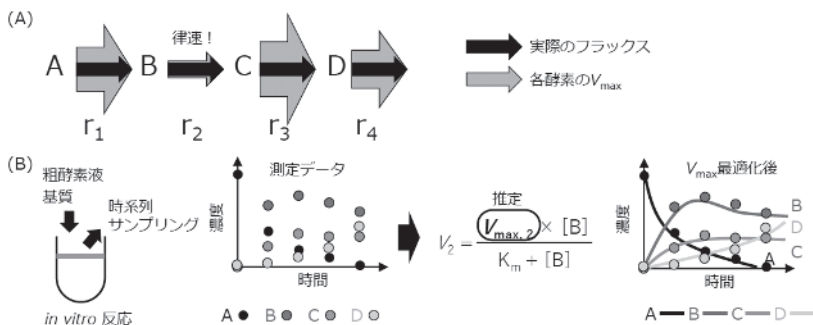


図2 動的モデルを利用した *in vitro* 酵素 V_{\max} の推定

(A) フラックスと V_{\max} の関係の模式図、(B) *in vitro* 酵素 V_{\max} 推定法の概要。Kitamura et al., 2021 の図を改変した。

5 おわりに

本稿では、微生物の代謝経路を改変するための、代謝工学の研究で用いられる代表的な手法について、その概要と利用方法を紹介してきた。数理モデルという解析基盤に基づいて設計・評価することで合理的な育種が可能になり、数多くの成功例が実現している。一方で、現在の育種では遺伝子の破壊や過剰発現といった極端な改変が行われている。目的物質の生産に理想的な

代謝状態を実現しようとした場合、代謝経路のある分岐点におけるフラックス比を 40 対 60 に振り分けるなど、より厳密にフラックスをチューニングすることが好ましい。今後は、合成生物学的なアプローチにより、代謝経路のフラックス分布を人為的に制御する仕組みを宿主細胞に実装するアプローチが必要になってくるであろう (Toya et al., 2020)。

謝辞

学生時代に本分野で研究を始める契機を与えていただき、また研究を進めるにあたりご指導いただいた慶應義塾大学環境情報学部の富田勝教授と曾我朋義教授、九州工業大学の清水和幸名誉教授 (当時、慶應義塾大学教授を兼任) に感謝申し上げます。また、本総説で取り上げた内容は、筆者が大阪大学にて得た知見を元に記述しています。大阪大学大学院情報科学研究科の清水浩教授と松田史生教授に感謝申し上げます。

引用文献

- Antoniewicz, M. R., Kelleher, J. K., Stephanopoulos, G. (2006) "Determination of confidence intervals of metabolic fluxes estimated from stable isotope measurements", *Metab Eng.* 8(4), pp. 324-37.
- Antoniewicz, M. R., Kelleher, J. K., Stephanopoulos, G. (2007) "Elementary metabolite units (EMU): a novel framework for modeling isotopic distributions", *Metab Eng.* 9(1), pp. 68-86.
- Gleizer, S., Ben-Nissan, R., Bar-On, Y. M., Antonovsky, N., Noor, E., et al. (2019) "Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO₂", *Cell.* 179(6), pp. 1255-63.
- Heirendt, L., Arreckx, S., Pfau, T., Mendoza, S. N., Richelle, A., et al. (2019) "Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v.3.0", *Nat Protoc.* 14(3), pp. 639-702.
- Ishii, N., Nakahigashi, K., Baba, T., Robert, M., Soga, T., et al. (2007) "Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations", *Science.* 316(5824), pp. 593-7.
- Kajihata, S., Furusawa, C., Matsuda, F., Shimizu, H. (2014) "OpenMebius: an open source software for isotopically nonstationary ¹³C-based metabolic flux analysis", *Biomed Res Int.* 2014, 627014.
- Keller, P., Noor, E., Meyer, F., Reiter, M. A., Anastassov, S., et al. (2020) "Methanol-dependent *Escherichia coli* strains with a complete ribulose monophosphate cycle", *Nat Commun.* 11(1), 5403.
- Kitamura, S., Shimizu, H., Toya, Y. (2021) "Identification of a rate-limiting step in a metabolic pathway using the kinetic model and *in vitro* experiment", *J Biosci Bioeng.* 131(3), pp. 271-6.
- Kitamura, S., Toya, Y., Shimizu, H. (2019) "¹³C-Metabolic flux analysis reveals effect of phenol on central carbon metabolism in *Escherichia coli*", *Front Microbiol.* 10, 1010.
- Peng, L., Arauzo-Bravo, M. J., Shimizu, K. (2004) "Metabolic flux analysis for a *ppc* mutant *Escherichia coli* based on ¹³C-labelling experiments together with enzyme activity assays

- and intracellular metabolite measurements”, *FEMS Microbiol Lett.* 235(1), pp. 17-23.
- Shimizu, K. (2004) “Metabolic flux analysis based on ¹³C-labeling experiments and integration of the information with gene and protein expression patterns”, *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 91, pp. 1-49.
- Shimizu, H., Toya, Y. (2021) “Recent advances in metabolic engineering-integration of in silico design and experimental analysis of metabolic pathways”, *J Biosci Bioeng.* 132(5), pp. 429-36.
- Shupletsov, M. S., Golubeva, L. I., Rubina, S. S., Podvyaznikov, D. A., Iwatani, S., et al. (2014) “OpenFLUX2: ¹³C-MFA modeling software package adjusted for the comprehensive analysis of single and parallel labeling experiments”, *Microb Cell Fact.* 13, 152.
- Takahashi, K., Kaizu, K., Hu, B., Tomita, M. (2004) “A multi-algorithm, multi-timescale method for cell simulation”, *Bioinformatics.* 20(4), pp. 538-46.
- Tokuyama, K., Ohno, S., Yoshikawa, K., Hirasawa, T., Tanaka, S., et al. (2014) “Increased 3-hydroxypropionic acid production from glycerol, by modification of central metabolism in *Escherichia coli*”, *Microb Cell Fact.* 13, 64.
- Tokuyama, K., Toya, Y., Horinouchi, T., Furusawa, C., Matsuda, F., et al. (2018) “Application of adaptive laboratory evolution to overcome a flux limitation in an *Escherichia coli* production strain”, *Biotechnol Bioeng.* 115(6), pp. 1542-51.
- Toya, Y., Shimizu, H. (2020) “Flux controlling technology for central carbon metabolism for efficient microbial bio-production”, *Curr Opin Biotechnol.* 64, pp. 169-174.
- Toya, Y., Shimizu, H. (2022) “Metabolic pathway engineering for the non-growth-associated succinate production in *Escherichia coli* based on flux solution space”, *J Biosci Bioeng.* 134(1), pp. 29-33.
- Toya, Y., Shiraki, T., Shimizu, H. (2015) “SSDesign: Computational metabolic pathway design based on flux variability using elementary flux modes”, *Biotechnol Bioeng.* 112(4), pp. 759-68.
- Toya, Y., Ohashi, S., Shimizu, H. (2018) “Optimal ¹³C-labeling of glycerol carbon source for precise flux estimation in *Escherichia coli*”, *J Biosci Bioeng.* 125(3), pp. 301-5.
- Trinh, C. T., Unrean, P., Srienc, F. (2008) “Minimal *Escherichia coli* cell for the most efficient production of ethanol from hexoses and pentoses”, *Appl Environ Microbiol.* 74(12), pp. 3634-43.
- von Kamp, A., Schuster, S. (2006) “Metatool 5.0: fast and flexible elementary modes analysis”, *Bioinformatics.* 22(15), pp. 1930-1.
- Wada, K., Toya, Y., Banno, S., Yoshikawa, K., Matsuda, F., et al. (2017) “¹³C-metabolic flux analysis for mevalonate-producing strain of *Escherichia coli*”, *J Biosci Bioeng.* 123(2), pp. 177-82.
- Yoshikawa, K., Toya, Y., Shimizu, H. (2017) “Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for enhanced ethanol production based on flux balance analysis”, *Bioprocess Biosyst Eng.* 40(5), pp. 791-6.

[受付日 2022. 7. 5]