

日本—アメリカ 国際共同研究「低炭素社会のためのメタボロミクス」 平成 27 年度 年次報告書	
研究課題名 (和文)	1-ブタノール生産に資する新規メタボリック解析システムの開発
研究課題名 (英文)	Metabolomics: Development of novel metabolic analysis system for 1-butanol production
日本側研究代表者氏名	福崎英一郎
所属・役職	大阪大学大学院工学研究科
研究期間	平成 27 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

1. 日本側の研究実施体制

ワークパッケージ①	1-ブタノール生合成経路中代謝物の絶対定量法の構築	
氏名	所属機関・部局・役職	役割
福崎英一郎	大阪大学・工学研究科・教授	LC/MS 分析条件の最適化
サスティア プラマ プトリ	大阪大学・工学研究科・特任助教	絶対定量法の構築
中山泰宗	崇城大学・応用微生物工学科・ 准教授	絶対定量法の構築
新田克章	大阪大学・工学研究科・学生	絶対定量法の構築

ワークパッケージ②	微生物中代謝産物の絶対定量を行うためのデータ処理システムの開発	
氏名	所属機関・部局・役職	役割
福崎英一郎	大阪大学・工学研究科・教授	データ解析システムの応用研究への適用
津川裕	理研植物科学研究センター・研究員	データ解析システムの運用方法の最適化

ワークパッケージ 3		セルワイドな代謝動態モデルの開発
氏名	所属機関・部局・役職	役割
福崎英一郎	大阪大学・工学研究科・教授	メタボローム解析データを用いたモデルの調整
サスティア プラマ プトリ	大阪大学・工学研究科・特任助教	アンサンブルモデリングから得られた知見に基づく遺伝子改変
新田克章	大阪大学・工学研究科・学生	アンサンブルモデリングから得られた知見に基づく遺伝子改変

ワークパッケージ 4		シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 のアンサンブルモデルの構築
氏名	所属機関・部局・役職	役割
清水 浩	大阪大学・情報科学研究科・教授	シアノバクテリア <i>Synechosystis</i> sp. 6803 のアンサンブルモデルを高精度化
松田史生	大阪大学・情報科学研究科・准教授	中心代謝経路の制御ネットワークの解明・メタボロームデータ、プロテオームデータの取得
戸谷吉博	大阪大学・情報科学研究科・助教	シアノバクテリア <i>Synechosystis</i> sp. 6803 のアンサンブルモデルを高精度化・フラックスデータの取得

ワークパッケージ 5		メタボロミクスと代謝フラックス解析の統合によるシアノバクテリアのアンサンブルモデルの改良
氏名	所属機関・部局・役職	役割
清水 浩	大阪大学・情報科学研究科・教授	<i>S. elongatus</i> PCC7942 の野生株および 1-butanol 生産株の中心炭素代謝経路の代謝フラックス解析
松田史生	大阪大学・情報科学研究科・准教授	INST- ¹³ C-MFA 法のためのデータ解析法の確立
戸谷吉博	大阪大学・情報科学研究科・助教	INST- ¹³ C-MFA 法のための実験条件の確立
和田圭介	大阪大学・情報科学研究科・学生	INST- ¹³ C-MFA を用いた <i>S. elongatus</i> PCC7942 の解析
岡橋伸幸	大阪大学・情報科学研究科・学生	INST- ¹³ C-MFA 法のためのデータ解析法の確立

ワークパッケージ 6		ナノ LC-MRM-MS をもちいたシアノバクテリア中心代謝酵素定量プロテオミクス法の開発
------------	--	---

氏名	所属機関・部局・役職	役割
松田史生	大阪大学・情報科学研究科・准教授	<i>S. elongatus</i> PCC7942 の野生株および 1-butanol 生産株の定量プロテーム解析法の確立
清水 浩	大阪大学・情報科学研究科・教授	<i>S. elongatus</i> PCC7942 の野生株および 1-butanol 生産株の定量プロテーム解析とアンサンブルモデリングへの適用
植林希代加	大阪大学・情報科学研究科・学生	<i>S. elongatus</i> PCC7942 の野生株および 1-butanol 生産株の定量プロテーム解析

ワークパッケージ7		1-ブタノール生産組換え大腸菌株の改良
氏名	所属機関・部局・役職	役割
福崎英一郎	大阪大学・工学研究科・教授	1-ブタノールストレス耐性向上を志向した遺伝子改変戦略立案
サスティア プラマ プトリ	大阪大学・工学研究科・特任助教	1-ブタノール暴露による細胞内代謝物変化の解析
ワルタ・アルバレス・ラビニヤ	大阪大学・工学研究科・特任研究員	1-ブタノールストレス耐性向上を志向した遺伝子改変戦略立案
中島広裕	大阪大学・工学研究科・学生	添加物質濃度の最適化検討
テオ・シャオ・テイ	大阪大学・工学研究科・特任研究員	1-ブタノールストレス感受性代謝反応経路の推定
阿知和弘樹	大阪大学・工学研究科・学生	1-ブタノールストレス感受性代謝反応経路の推定

ワークパッケージ8		1-ブタノール生産組換え藍藻の改良
氏名	所属機関・部局・役職	役割
福崎英一郎	大阪大学・工学研究科・教授	1-ブタノール高生産を志向した遺伝子改変戦略立案
サスティア プラマ プトリ	大阪大学・工学研究科・特任助教	1-ブタノール高生産を志向した遺伝子改変戦略立案
ワルタ・アルバレス・ラビニヤ	大阪大学・工学研究科・特任研究員	1-ブタノール高生産組換え藍藻の構築
アトニス メガ ファヒマ	大阪大学・工学研究科・学生	遊離脂肪酸定量

2. 日本側研究チームの研究目標及び計画概要

本プロジェクトではメタボロミクス（福崎研，日本），代謝フラックス解析（清水研，日本），アンサンブルモデリング（Liao 研，アメリカ）における3つの技術を統合し，外来性代謝経路を用いたアルコール生産組換え微生物の生産性向上を目的としている。

1年目は，日本側は1-ブタノール生産組換え大腸菌・藍藻における¹³C標識細胞抽出物を内部標準物質に用いた細胞内代謝物濃度の絶対定量法の最適化と，アシル CoA 中間体絶対定量手法の感度ならびに確度向上を行う。さらに，¹³C標識内部標準物質に基づく絶対定量法用のソフトウェア開発を行う。アメリカ側はその代謝物濃度データをアンサンブルモデルに応用し，アンサンブルの中から実データに沿うモデルをスクリーニングする。本共同研究により，生産性向上のためにデザインされた代謝経路におけるモデル性能の向上が期待される。

3. 日本側研究チームの実施概要

本プロジェクトでは，メタボロミクスを中心とした大腸菌，出芽酵母，藍藻などの組換え微生物の1-ブタノール生産性を向上させるためのプラットフォーム技術を開発することを目的とした。メタボロミクスは，バイオ燃料開発における宿主微生物の改良のための有力な技術である。メタボロミクス技術を用いて，バイオ燃料生産に直接関わっている代謝経路，例えば中間代謝における代謝物に注目し，その動態を解明・追跡することに加え，直接的に関与しない代謝経路でバイオ燃料生産により大きく変動した代謝物の検出も可能である。これらのメタボロミクスによる情報は，工業微生物の最適化に重要な情報になると期待される。本プロジェクトでは具体的に（1）メタボロミクスの基盤となる分析技術の開発（福崎，清水チーム），（2）メタボローム解析と代謝モデルを統合する手法の開発（清水，Liao チーム），および（3）上記技術や手法を用いた生産菌の改良（Liao，清水，福崎チーム）を実施した。本研究ではGC-MSおよびLC-MS/MSを用いた，新規かつ網羅的な使いやすい分析システムを構築し，糖リン酸，核酸，多価有機酸など重要代謝物の幅広い分析を可能にした。また，1-ブタノール生産経路に密接に関わっている様々な CoA 化合物の網羅的かつ定量的な分析メソッドの開発も行った。¹³C代謝フラックス解析法の構築を行ない，代謝経路の活性評価へと利用した。タンデム四重極型質量分析装置を用いて中心代謝中間体を高感度に検出し，その同位体濃縮度を測定した。

代謝工学への貢献を指向した独自性の高いメタボローム分析システム開発プロジェクトから，低炭素化社会を実現するための代謝工学を推進する有用なメタボロミクスツールの構築を行った。本研究は燃料生産のカーボンフットプリントの軽減につながる技術を提供し，低炭素社会の実現に貢献した。本研究は高度なメタボローム分析技術をもつ日本側チームと，代謝工学研究のリーディンググループである米国チームがパートナーシップの関係をもつことで，US チームと日本チームの双方がもつ専門性を生かすことで初めて成果を上げることができた。代謝工学のためのメタボローム分析法を日本チームが構築し，これを用いて米国チームが作製した改変微生物株の分析を実施した。日本チームによるメタボロミクス，メタボリックフラックス分析に基づく知見が，さらなる生産株向上戦略のためにUS チームに提供され，US チームがすべての遺伝子改変をおこなった。また，アンサンブルモデルの構築にもメタボロームデータを利用した。

このようなシナジーを促進するため1)Cross-Pacific セミナー，2)学生/ポスドク訪問プログラム，3)国際メタボロミクスワークショップを実施した。Cross-Pacific セミナーでは，アイデア交換の場を設けることで異なるバックグラウンドを持つ両当事者間でより実りのある議論をおこない新たな研究戦略の立案につながった。総計9名の学生およびポスドク，PI がそれぞれ1-2ヶ月程度の相互訪問を実施した。これにより学生や若手研究者が異なる環境において独自の研究を行うことが可能になり，将来のキャリア形成に有用であるグローバルな視点を得るのはもちろん，複合領域のスキルを習得する場が構築されたといえる。

本年度は1-ブタノール生産大腸菌とシアノバクテリアのアンサンブルモデリングを構築することに成功した。構築された大腸菌向けのモデルはよい予測性を持つものの未だ予測していないピルビン酸および酪酸の蓄積の予測を達成できなかった。代謝情報を予測モデルに

組み込むことで副産物において主にピルビン酸および酢酸の予測清楚を大きく改善することを達成し、遺伝子欠損および過剰発現のための重要な遺伝子ターゲットを予測することに成功した。

またメタボローム解析から得られた知見をもとにアメリカチームは生産経路のボトルネックを改善するための酵素活性を改善した菌株を作成した。この試みは結果としてそれぞれの菌株の1-ブタノール生産性を2倍向上させ、最終的な収量として40%の改善を達成した。大腸菌における新たな収量はこれまでの1-ブタノール生産菌株の中で最大を達成した。現在、我々のチームは最大生産量を達成した菌株を用いて次段階の菌株改良を行っている。また同時にコスト削減のための最小培地での生産量増加および1-ブタノール耐性向上を目指している。