

(平成 25 年度 研究実施報告)

国際科学技術共同研究推進事業 (戦略的国際共同研究プログラム)

(研究領域「低炭素社会のためのメタボロミクス」)

研究課題名「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」

平成25年度実施報告書

代表者氏名 福崎英一郎
(大阪大学工学研究科・教授)

1. 研究実施内容

1-1. 研究実施の概要 公開

GC/MS を基盤としたノンターゲットとターゲット代謝物プロファイリングシステムの開発およびその1-ブタノール生産トランスジェニック大腸菌および藍藻の代謝の解明への応用

1-ブタノール生産性向上のための代謝制御機構解析

近年、代謝工学技術は大きく発展し、種々のバイオ燃料を生産する遺伝子組換え微生物の育種に成功してきた。しかしながら、実用化に向けてはさらなる代謝経路の最適化を目的とした合理的な遺伝子改変戦略が必要となる。そこで、メタボロミクスは表現型に最も近い所から生物学的な特徴の違いを捉えるのに適していると考えられていることから、微生物による物質生産性の向上を目的とした分子育種戦略構築において非常に有効な手段であると期待されている。本研究では、メタボロミクス技術の有用性を示すモデルとして1-ブタノール生産遺伝子組換え大腸菌を用いた。代謝解析の結果は生産性の異なる菌株においてそれぞれの特徴を正確に表し、さらに代謝物の網羅的解析により1-ブタノール生産における律速段階を推定することができ、生産量増加を目的とした育種につながると期待される。

1-ブタノール生産組換え藍藻における代謝プロファイリング

共同研究先である UCLA の Liao 研究室は、アシル CoA 体を中間体とする1-ブタノール生合成経路を藍藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 へ導入することで、炭素固定による1-ブタノール生合成に成功した。本研究では LC/MS を用いた糖リン酸、有機酸などの中央代謝に関わるアニオンや、1-ブタノール生合成中間体であるアシル CoA 体の代謝プロファイリングから、生産性向上に資する代謝改変ターゲットの探索を行った。まず、生産能の異なる菌株はそれぞれ導入された1-ブタノール生産経路に応じた特徴的な代謝状態を有していることが観察された。また、菌株間の代謝プロファイリングから生産性向上に資すると考えられる代謝改変ターゲットを発見することができた。さらに新たなターゲットを探索するために安定同位体を用いた代謝ターンオーバー解析を実施する予定である。

1-プロパノール生産大腸菌の Dual-pathway によるシナジの代謝ターンオーバー解析

1-プロパノール生産大腸菌における細胞内代謝の動態を調べるため、代謝ターンオーバー解析を行った。本手法は標識基質を加えた後のアイソトポマー比の経時変動を代謝物毎に観測することで、代謝全体がどのように動いているかを調べる手法である。本研究ではキャピラリー電気泳動質量分析およびガスクロマトグラフィー質量分析を用いて、 $^{13}\text{C}_6$ -グルコースの代謝をモニターし、スレオニン経路、シトラマル酸経路および両経路導入した大腸菌における1-プロパノール生産時の代謝動態を確認した。結果として両経路による1-プロパノールの生産では、スレオニン経路の TCA 回路依存性および副産物の乳酸の生産が低減されていることが確認された。またスレオニン経路によりシトラマル酸経路のターンオーバーが加速されていることも観測され、両経路が相乗的に働いていることが確認された。

非ストレス条件下で培養したサンプルのメタボローム解析によるストレス耐性に関わる代謝物の予測

このタスクでは、最初は出芽酵母をモデルに概念実証を行うために、酵母の培養、サンプル回収、代謝物抽出、GC/MS による分析など、酵母メタボロミクス各段階の最適化を行った。その後、予備実験結果により選ばれた 20 株前後の酵母変異株についてメタボローム解析および 1-ブタノール耐性測定を実施した。次に、各々の代謝物計測量を説明変数とし、耐性性能を応答変数として、直交潜在構造投影法 (Orthogonal Projection to Latent Structures, OPLS) により代謝物と耐性との関係を説明する回帰モデルを構築した。このモデルより、代謝物間の相関や、代謝物と耐性との相関をまとめた指標を取得し、値に基づいて重要代謝物を選抜した。なお、選抜された代謝物の 1-ブタノール耐性における重要性を検証するために、それぞれの分解経路における酵素遺伝子の変異株を入手し、耐性測定およびメタボローム解析を行った。その結果、モデルに基づいて選抜した株の耐性指標値は親株より有意に上昇した、代謝物プロファイルも前のモデルと高い適合度を示した。この結果より、メタボローム解析によるストレス耐性に寄与する代謝物の選抜および耐性株の取得の可能性が示された。また、本戦略の一般性の検証は現在酵母のイソブタノール耐性や大腸菌の種々アルコール耐性について行われているところである。

2. 研究実施体制 公開

2-1. 日本側の研究実施体制

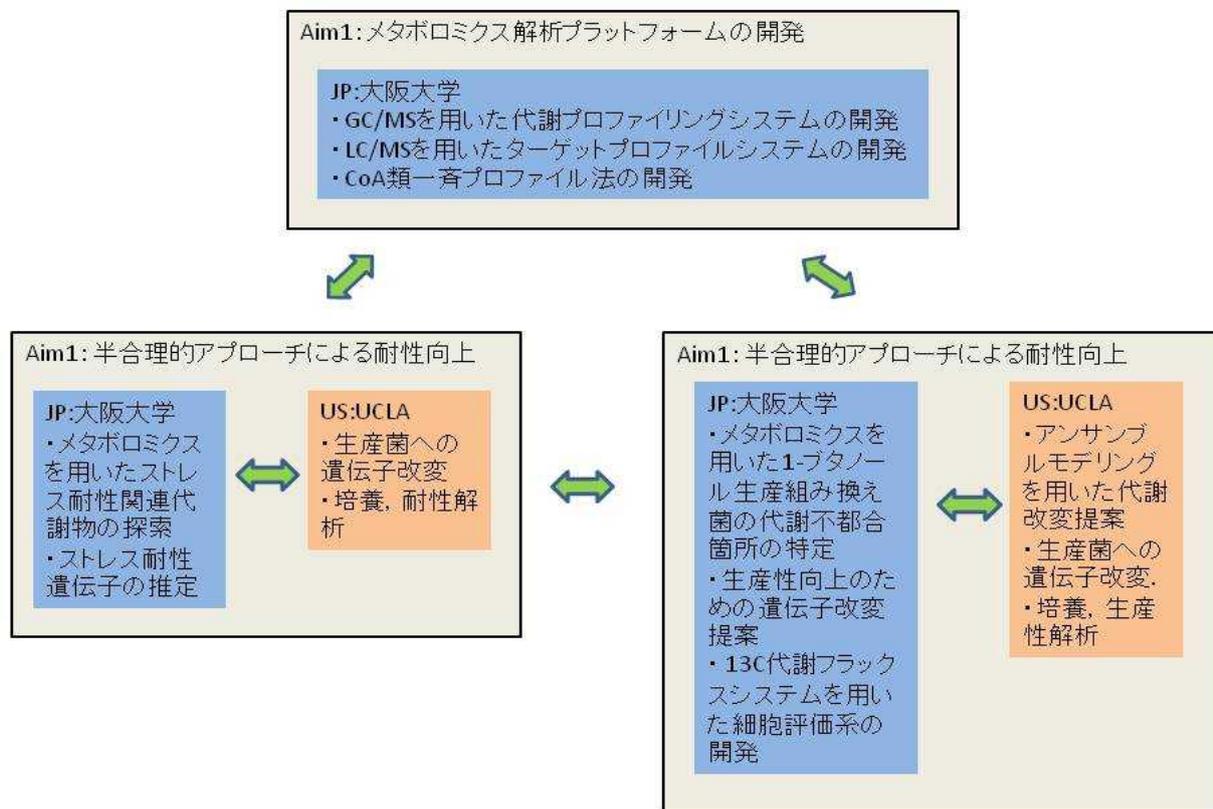
研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	福崎英一郎	大阪大学	工学研究科	教授
主な共同研究者	清水浩	大阪大学	情報科学研究科	教授
主な共同研究者	松田史生	神戸大学	工学研究科	准教授

松田史生は平成 24 年 10 月より大阪大学に異動し、清水グループと統合した。

2-2. 相手側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	James Liao	UCLA	化学工学科	教授

2-3. 両国の研究実施体制



3. 原著論文発表 公開

3-1. 原著論文発表

1) 発行済論文数

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	(0 件)
国際誌 7 件	(0 件)
計 7 件	(0 件)

※本共同研究の相手側チーム研究者との共著に限る

1. Nakayama Y, Putri SP, Bamba T, Fukusaki E. Metabolic distance estimation based on principle component analysis of metabolic turnover. J Biosci Bioeng. 2014 Mar 26. pii: S1389-1723(14)00066-8. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.02.014. [Epub ahead of print]

2. Matsuda F, Tsugawa H, Fukusaki E. Method for Assessing the Statistical Significance of Mass Spectral Similarities Using Basic Local Alignment Search Tool Statistics. *Anal Chem.* 2013 Sep 3;85 (17):8291-7. doi: 10.1021/ac401564v. Epub 2013 Aug 14.
3. Kawase N, Tsugawa H, Bamba T, Fukusaki E. Different-batch metabolome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* based on gas chromatography/mass spectrometry. *J Biosci Bioeng.* 2013 Aug 19. doi:pii: S1389-1723(13)00270-3. 10.1016/j.jbiosc.2013.07.008. [Epub ahead of print]
4. Tsugawa H, Arita M, Kanazawa M, Ogiwara A, Bamba T, Fukusaki E. MRMPROBS: Data Assessment and Metabolite Identification Tool for Large-scale MRM-based Widely Targeted Metabolomics. *Anal Chem.* 2013 May 21;85(10):5191-9. doi: 10.1021/ac400515s. Epub 2013 May 1.
5. Tsugawa H, Tsujimoto Y, Sugitate K, Sakui N, Nishiumi S, Bamba T, Fukusaki E. Highly sensitive and selective analysis of widely targeted metabolomics using gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. *J Biosci Bioeng.* 2013 Jul 15. doi:pii: S1389-1723(13)00228-4. 10.1016/j.jbiosc.2013.06.009. [Epub ahead of print]
6. Tsugawa H, Bamba T, Shinohara M, Nishiumi S, Yoshida M, Fukusaki E. Practical non-targeted gas chromatography/mass spectrometry-based metabolomics platform for metabolic phenotype analysis. *J Biosci Bioeng.* 2011 Sep;112(3):292-8. Epub 2011 Jun 8.
7. Tsugawa H, Tsujimoto Y, Arita M, Bamba T, Fukusaki E. GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *BMC Bioinformatics.* 2011 May 4;12:131.

1) 未発行論文数

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	(0 件)
国際誌 1 件	(0 件)
計 1 件	(0 件)

※本共同研究の相手国チーム研究者との共著に限る

1. Kajihata, S., Furusawa, C., Matsuda, F., Shimizu, H., OpenMebius: An open source software for isotopically nonstationary ^{13}C -based metabolic flux analysis. *BioMed Research International*, accepted 2014 May

*微生物プロセスで汎用的に利用可能な代謝フラックス解析システムを構築した。これにより、代謝情報をエクセルシートに整理してインプットすることで、自動で代謝モデルが合成され、利用可能になった。このソフトウェアは、オープンソースのソフトウェアとして公開していくことを考えている。

以上