

## SICORP 日本-アメリカ

### 「低炭素社会のためのメタボロミクス」分野 事後評価結果

#### 1. 共同研究課題名

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

#### 2. 日本-相手国研究代表者名（研究機関名・職名）：

福崎 英一郎（大阪大学 大学院工学研究科・教授）

James C. Liao（University of California, Los Angeles・Professor,）

#### 3. 研究実施概要

1-ブタノールはトウモロコシなどのバイオマスを原料とするバイオ燃料の1つである。燃焼によって発生するエネルギー量がエタノールよりも多く、ガソリンと容易に混合することが利点とされる。海水や淡水に生息する光合成細菌 *Synechococcus elongatus* は光合成によって細胞増殖に必要な物質と化学エネルギーを獲得している。光合成細菌に生物工学的的手法により 1-ブタノール生産機能を付与することができれば、バイオマスを経ないで直接にバイオ燃料を生産することになるので、低炭素社会の実現に寄与することが期待される。

本研究課題は光合成細菌 *Synechococcus elongatus* とモデル微生物大腸菌 *Escherichia coli* のそれぞれ 1-ブタノール生産組み換え株による 1-ブタノール生産量を改善することを目的として次の3項目について研究開発を実施した。(1) 代謝物の細胞内濃度や代謝流速の測定と解析をするメタボローム解析プラットフォームを開発、(2) 代謝物の実測データに基づいて代謝速度論モデルを作成、(3) このモデルに基づいて生物工学的的手法で 1-ブタノール生産株の改変、培養をおこなって 1-ブタノール生産量の向上、について研究開発をおこなった。日本チームは主に 1) と 3) を、米国チームは主に 2) をそれぞれ分担して、2)と 3)を日米両チーム間で繰り返すことによって生ずる相乗効果が期待された。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 研究の達成状況、得られた研究成果及び共同研究による相乗効果

（論文・口頭発表等の外部発表など）

日本チームは GC-MS と LC-MS/MS による細胞試料のメタボローム分析技術を確立し、データ処理に必要なソフトウェアを開発した。これらを用いて網羅的及び対象とする代謝物の細胞内濃度や代謝流速データを得た。米国チームはこれらのデータに基づいて 1-ブタノール生産量の向上を目指した代謝設計プラットフォームであるアンサンブルモデリング (EM) を開発した。

日本チームは開発したメタボローム解析技術を用いて、*E. coli* 生産株のリン酸化糖をはじめ核酸類、CoA およびアシル化 CoA、有機酸などの代謝物の細胞内濃度と代謝流速を測定した。これら代謝物の定量的データに基づいて EM の諸パラメータ値の設定をおこなうことができた。この代謝モデルは、*E. coli* 生産株

による効率的な 1-ブタノール生産を目的とした、生物工学的な改変戦略に有用な指針を与えることができた。このようにして 1-ブタノール生産に最適化された *E. coli* の 1-ブタノール生産株は比較的高い力価で 1-ブタノールを生産した。

日米両チームの研究協力は効果的におこなわれた。米国チームは *E. coli* と *S. elongatus* の 1-ブタノール生産株を提供した。日本チームは新しく開発したメタボローム解析技術と  $^{13}\text{C}$  標識代謝物を用いた  $^{13}\text{C}$ -代謝流速解析 ( $^{13}\text{C}$ -MFA) を用いて、提供された *E. coli* 生産株の代謝解析をおこなった。得られたメタボローム解析データと  $^{13}\text{C}$ -MFA データは米国チームに提供されて、EM のモデル構造とモデルパラメータの決定に利用された。律速反応のアセチル-CoA 近傍の CoA 不均衡は EM を利用した合理的な代謝工学的戦略にもとづいて解消された。これは 1-ブタノール生産の向上に反映した。このように密接な日米両チームの協力によってグルコースを炭素源として培養した大腸菌 299 株の 1-ブタノール生産能 (力価単位) を 15 g/L から 18.3 g/L に高めた。

これに対して、光合成細菌 *S. elongatus* 野生株については EM を作成することはできたが、本研究課題の主要目的である *S. elongatus* の組み換え 1-ブタノール生産株の改良では EM の構築に必要な精度の高い基礎データを測定することができなかった。目的とした日米間で (1) ~ (3) サイクルを一度も実行することなく一部の改良 (415 mg/l ; 力価単位) にとどまった。

本共同研究プログラムの実施期間中に、本共同研究チームは、Skype をとおして定期的に研究経過を報告する Cross-Pacific セミナーと日米チームが一同に会する会議を毎年開催するほかに、大学院生や博士研究院の相互訪問プログラム、国際メタボロミクスワークショップへの参加を支援してきた。これらを通して計 17 人 (延べ人数) の大学院生と 6 人の博士研究員が互いに相手チームへ訪問して、研究室に滞在して自ら研鑽を積み、研究を実施した。

また研究成果をメタボロミクス研究社会に公表する国際ワークショップを 3 年目 (2013 年) に日米共同で開催した。

これら日本チームの研究成果は研究論文 29 編 (うち 3 編は米国チームとの共著)、総説や書籍の執筆 7 編にまとめて国際的な学術雑誌などから公表された。これに対してマススペクトルや代謝プロファイルなどの実験データをデータベース化して公開する努力は十分ではなかった。

#### 4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、わが国の科学技術力強化への貢献

日本チームが開発した GC-MS と LC-MS/MS を用いたメタボローム測定技術はデータ処理をおこなう MRMPROBS や MRM-DIFF、AIOutput などのソフトウェアを組み合わせることによって優れたメタボロミクスプラットフォームとなっている。さらに代謝流速解析 (MFA) プラットホームの中核となるソフトウェア OpenMedius は  $^{13}\text{C}$  同位体標識と非標識グルコースで培養した細胞の代謝物を対

比、分析することによって<sup>13</sup>C-MFAを精度良く測定することができる汎用性の高いものである。これらのソフトウェアは公開されている。

これらのプラットフォームはリン酸化糖をはじめ核酸類、CoAおよびアシル化CoA、有機酸などの代謝物の細胞内濃度と代謝流速を測定することに広く利用することができる。例えば、セルロースを用いて糖化と発酵を同時におこなう方法（SSF）や統合バイオマス処理（CBP）など、次世代バイオ燃料生産の開発研究にも役立つことが期待される。