

## 終了報告書(公開用要約)

研究課題	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
日本側研究代表者(所属組織)	福崎 英一郎(大阪大学大学院工学研究科)
アメリカ側研究代表者(所属組織)	ジェームズ・リャオ(カリフォルニア大学ロサンゼルス校化学・生物分子工学専攻)

バイオ燃料生産微生物の設計図を描くためのメタボローム分析技術の開発

### プロジェクトの目的と課題

代謝工学のためのメタボローム分析プラットフォームを構築し、1-ブタノール生産大腸菌および光合成細菌を改良する。

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て、直接に関係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。具体的に本プロジェクトでは(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)以上の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。

### 用いた技術、手法

代謝工学を加速するメタボローム分析および代謝モデリング技術の構築

本研究では GC-MS、LC-MS/MS を用いた、新規、網羅的、かつ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。<sup>13</sup>C 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。

一方、メタボロミクスより得られたデータを活用する新規の応用法もいくつか開発した。メタボロームデータから微生物株を改良する知見を得る半合理的手法を開発した。メタボロームデータの比較解析から、メカニズムの詳細に触れることなく微生物株の特性を改善するためのヒントを得ることができた。さらに代謝モデルの速度論パラメータを絞り込む手法の開発を行なった。まず代謝モデルのアンサンブルを作成し、次に代謝反応活性を変化させたときの最終産物の予測生産量が実データに合致するモデルを選択することで、予測力の高いモデルを選抜する手法を開発した。

## 研究成果と社会的インパクト

本プロジェクトは満足のいく結果を残し、当初の目的である有用化学物質ブタノールを生産する微生物のメタボローム解析を行うための有用プラットフォームの構築に成功したと言える。日本国、米国両国間における高度な共同研究の結果、メタボロミクスの代謝モデルへの統合に成功し、大腸菌およびシアノバクテリアにおけるブタノール生産量と酵母におけるブタノール耐性を改善することに成功した。結果として、本プロジェクトにおいて我々が構築した菌株は世界最高量の生産量を達成した（大腸菌においてグルコースを炭素源とした場合：18.3 g/L、シアノバクテリアにおいて二酸化炭素を炭素源とした場合：415 mg/L）。本プロジェクトにおいて開発した全ての実験手法は我々のチームで編集した“Mass spectrometry-based metabolomics: a practical guide”に記載済みである。また本プロジェクトで開発されたソフトウェアは全て公開されている。

我々の統合アプローチは菌株改良を目指すための代謝工学手法のガイドとして有用であることが証明され、結果としてブタノール生産量を改善することに成功した。本研究を通して持続可能かつ環境に友和なエネルギー源であるブタノールの高生産性菌株の構築に成功したことで低炭素社会実現のための大きな一助を達成したと自負している。

## アメリカチームとの相乗効果に基づく特記成果

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、日本チームの双方が、各チームの専門分野へ集中する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成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 セミナーでアイデア交換の場が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 17 名の学生および 6 名のポスドク、8 名の PI がそれぞれ両国間を訪問した。これにより学生や若手研究者が独自の異なる環境において研究を行うことが可能になり、彼らの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もたらされたといえる。

また年に一度全てのメンバーが参加するチームミーティングを開催した。加えて代謝工学のためのメタボロミクスに関する特別な議論を伴う国際シンポジウムを開催した。最終年度には 2016 年 11 月にアメリカにて日本からのチームメンバーを招いたメタボロミクスワークショップを開催した。

## 研究成果物

分析化学、代謝工学、生命科学などの分野の国際的な査読誌に 15 報の学術論文を発表した。メンバーの学生や研究員は国際メタボロミクス学会等で賞を獲得した。広範囲なターゲットメタボロミクスシステムのデータ解析プロセスを促進するために Aloutput, MRMPROBS、MRM-DIFF といったデータソフトウェア、代謝フラックス解析のためのソフトウェア OpenMebius を開発した。このプロジェクトで開発されたすべてのソフトウェアは公開されている。

本プロジェクトから得た結果は代謝工学における研究手法を豊かにし、メタボロミクスの適用分野を広げるものであり、本研究分野に大きく影響を与えるものであると言える。また本共同研究

の結果として、高生産性のブタノール生産菌株の作成に成功したことから本研究は燃料や化学物質の生産を微生物によって行っている多種の企業にとっても興味深いものになると予測される。最後に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。

Selected list of publications:

1. Lee Y, Rivera JGL, Liao JC. Ensemble Modeling for Robustness Analysis in engineering non-native metabolic pathways. *Metab Eng.* 2014;25:63-71.
2. Noguchi S, Putri SP, Lan EI, Lavina WA, Dempo Y, Bamba T, Liao JC, Fukusaki E. Quantitative target analysis and kinetic profiling of acyl-CoAs reveal the rate-limiting step in cyanobacterial 1-butanol production. *Metabolomics.* 2016 ;12(2):1-10.
3. Liao JC, Mi L, Pontrelli S, Luo S. Sammy Pontrelli, and Shanshan Luo. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(5):288-304.
4. Ohtake T, Pontrelli S, Laviña WA, Liao JC, Putri SP, Fukusaki E. Metabolomics-driven approach to solving a CoA imbalance for improved 1-butanol production in *Escherichia coli*. *Metab Eng* (16)30139-2. 2017
5. Kajihata S, Furusawa C, Matsuda F, Shimizu H. OpenMebius: an open source software for isotopically nonstationary <sup>13</sup>C-based metabolic flux analysis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:627014.
6. Nitta K, Laviña WA, Pontrelli S, Liao JC, Putri SP, Fukusaki E. OPLSR-based metabolomics approach for identification of gene targets for improvement of 1-butanol production in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* (accepted)

Organization of US-Japan joint research project



## プロジェクトの概要 (日本-米国)

