

令和 4 年 4 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14065

研究課題名(和文) 高効率バイオプロセスに向けた代謝制御プログラムによる微生物表現型の可塑的制御

研究課題名(英文) Dynamic control of microbial phenotypes by reprogram of metabolic regulatory network for efficient bioprocess

研究代表者

相馬 悠希 (Yuki, Soma)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：80781955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：バイオプロセスにおいて宿主内在性代謝経路と物質生産経路は直接的な競合関係にあり、「菌体増殖能の高い表現型」と「物質生産性の高い表現型」はトレードオフ関係にあり、バイオプロセスにおける生産性の向上の障害となっている。そこで本研究では、バイオプロセスの進行度に応じて表現型を最適に自己制御可能な微生物の設計・構築を目的とした新規代謝工学戦略の開発に取り組んだ。大腸菌において菌体増殖を制御する人工遺伝子回路を構築することで、様々な有用化合物生産において生産性の向上に成功した。また、人工合成クオラムセンシング機構に基づく振動回路を構築し、流加培養においても継続的に高い生産性を維持させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化石資源に依存しない持続可能な資源の活用を目指して、微生物などを用いたバイオプロセスによる再生可能資源からの有用物質生産の工業化(バイオリファイナー)が注目されている。しかしながら、実用コストを満足する様な十分な生産性を得られていない場合が多く、現状はバイオリファイナーの実現には至っていない。本研究では、バイオプロセスにおいて普遍的な課題である生産ユニットたる“菌体数”を効率的に確保と生産ユニットあたりの生産効率である“比生産性・比収率”の競合を解消し、生産性の効率化に資する方法論を考案・実証した。本研究は、再生可能資源を原料とした持続可能な有用化合物生産の基盤構築に貢献した。

研究成果の概要(英文)：In bioprocesses, host-intrinsic metabolic pathways and material production pathways are in direct competition with each other, and there is a trade-off between a "phenotype with high bacterial growth potential" and a "phenotype with high material productivity," which is an obstacle to improving productivity in bioprocesses. In this study, we developed a novel metabolic engineering strategy to design and construct microorganisms that can self-regulate their phenotypes optimally according to the progress of bioprocesses. By constructing synthetic genetic circuits that control bacterial growth of Escherichia coli, we succeeded in improving productivity in various useful compounds production. We also constructed an oscillatory circuit based on an artificial synthetic quorum sensing and succeeded in maintaining high productivity continuously in flow-assisted culture.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 人工遺伝子回路 人工代謝経路 バイオプロセス クオラムセンシング 代謝工学

1. 研究開始当初の背景

化石資源に依存しない持続可能な資源の活用を目指して、微生物などを用いたバイオプロセスによる再生可能資源からの有用物質生産の工業化が注目されているが、実用コストを満足する十分な生産性を得られていない場合が多い。バイオプロセスにおける総合的な生産性の最大化を図るには、生産ユニットたる“菌体数”を効率的に確保し、なおかつ生産ユニットあたりの生産効率である“比生産性・比収率”を最大化する必要がある。しかしながら実際には、“菌体増殖”のための内在性代謝経路と“目的化合物生産”のための物質生産経路は、互いに“共通の中間代謝物”を要求する競合関係にあるため、“菌体増殖に適した表現型”と“目的化合物生産に適した表現型”は事実上のトレードオフの関係にある。効率的なバイオプロセスを実現するためには、このトレードオフ関係の解消が不可欠であることは明らかであったが、従来の遺伝子の過剰発現やノックダウン・ノックアウトなどの“発酵プロセスを通じて静的な”遺伝子発現制御では、宿主生存に不可欠な代謝経路の活性と物質生産活性を両立することはできなかった(図1)。



図 1. 菌体増殖と目的化合物生産の間でのトレードオフによる総生産性の低下

近年、この問題を解決する新たな手法として、人工的に再構成された遺伝子発現制御システムである「人工遺伝子回路」や特定代謝物の濃度変動に応答する「バイオセンサー」などの「合成生物学的ツール」を用いた動的な代謝酵素遺伝子発現制御の有用性が注目され、試験的な応用が幾つか報告されている。これらの手法は近年、バイオプロダクション・代謝工学分野を世界的に牽引する著名な研究者らによって報告されており、微生物代謝制御のリプログラムによる「動的代謝工学」として認知され始めている。

応募者は既に、大腸菌において任意の遺伝子の発現動態を制御するための人工遺伝子回路として代謝トグルスイッチを構築し、バイオ燃料およびバイオプラスチック原料として利用可能な Isopropanol 生産への応用に成功している(図2)。同システムでは、クエン酸合成酵素遺伝子 (*glfA*) の発現を ON から OFF にコンディショナルに制御することで、菌体増殖に重要な TCA 回路への代謝フラックスを菌体増殖期の後に遮断する(図2B)。これにより、基幹中間代謝物の1つである Acetyl-CoA の細胞内レベルを飛躍的に向上させ(図2C)、これを前駆体とする Isopropanol の生産量を大幅に向上することに成功している(図2D)。また、その他複数の Acetyl-CoA 関連酵素遺伝子の発現も同時に制御することで、さらなる生産性の向上にも成功している。しかしながら、その生産効率は実用コストを満足するに十分なレベルに未だ達していない。真に高効率なバイオプロセスの実現に向けて、より抜本的な改善が必要である。

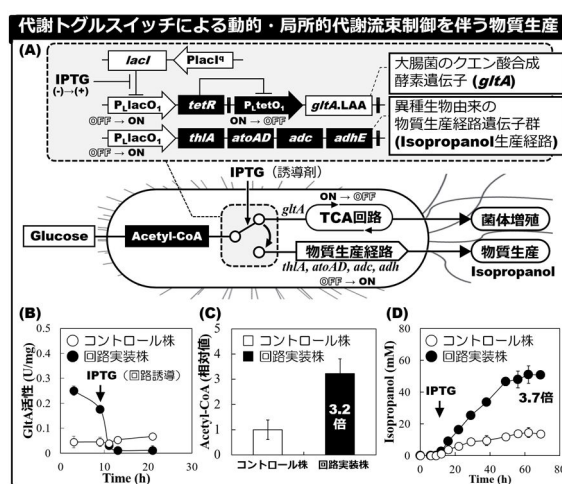


図 2. 代謝トグルスイッチによる局所的・動的代謝フラックス制御

2. 研究の目的

本研究は、内在性代謝フラックス容量の拡張と代謝フラックスの効率的な物質生産系への転換により、バイオプロセスの効率化に寄与する微生物代謝制御のリプログラムを実現することを目的とする。これを達成するためのアプローチとして以下の2つの実験を実施する

- (1). 人工遺伝子回路実装株の実験室適応進化による菌体増殖および代謝フラックス容量の増強
- (2). 炭素中央代謝の再構成による菌体増殖および代謝フラックス容量の増強

これまでに、動的代謝工学において宿主内在経路の代謝活性を増強することによって、物質生産に転用可能な代謝フラックスを拡大するような試みはなされていない。本研究では、実験室適応進化プロセスによる天然の適応応答を利用したトップダウンアプローチと、酵素進化学と遺伝子発現モジュールの再構成というボトムアップアプローチの2つの異なる方面から代謝フラックス容量に増大に取り組む。炭素中心代謝関連酵素の進化学によって代謝フラックス容量と菌体増殖の増強を試みた例は報告されていない。また、実験室適応進化は、突然変異と自然選択を利用して菌体増殖の促進された変異体を選抜する手法であるが、代謝制御を担う人工的な遺伝子発現制御システムを実装した菌株においてこれが実施された報告はなく、何れも学術的に新規な試みである。

### 3. 研究の方法

#### <人工遺伝子回路実装株の実験室適応進化による菌体増殖および代謝フラックス容量の増強>

従来の AcetylCo-A を前駆体とした Isopropanol 生産に加え、より汎用的な技術として発展させるには、Phosphoenolpyruvate, Pyruvate, Isocitrate, alpha-ketoglutarate, Succinate, Malony-CoA など、図3に示すような様々な基幹中間代謝物への適用が不可欠である。そこで本研究では、さまざまな基幹中間代謝物由来の有用化合物生産に適用可能な「代謝トグルスイッチライブラリ」を構築するとともに、これらを実装した大腸菌の最大増殖速度を向上させるための「実験室適応進化 (Adoptive Laboratory Evolution; ALE)」を実施する。ALEは、継代培養を繰り返すことで特定環境条件やストレスに適応して効率的に増殖な個体を選抜可能な進化手法である(図3)。これにより、高い菌体増殖能を示す表現型と効率的な代謝フラックス転換能を示す表現型の切り替えを塑的に制御可能な「表現型制御因子実装ライブラリ」の構築に取り組む。また、これらは、基幹中間代謝物由来の有用化合物生産性評価に加え、メタボローム解析によって代謝状態・表現型の変動を詳細に評価する。動的な遺伝子発現制御を摂動とする際の代謝状態への影響を評価することで、バイオプロセスの各過程に適切な表現型を実現するために必要な代謝改変方策を探索し、これに基いて逐次的な回路の再設計を実施するとともに、実験室進化プロセスにおける代謝動態制御ネットワークのリプログラムの過程の解明に取り組む。

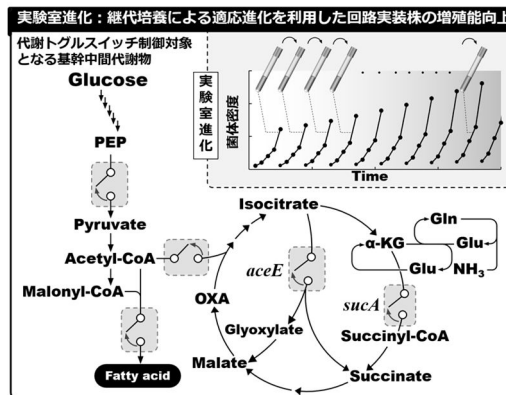


図3. 代謝トグルスイッチ実装株の実験室進化

#### <炭素中央代謝の再構成による菌体増殖および代謝フラックス容量の拡張>

内在性代謝経路の活性は、栄養源の違いや温度・浸透圧・溶存酸素濃度などの様々な環境因子の変化にตอบสนองするような遺伝発現制御システムの支配下にあるが、それらは必ずしも各環境において菌体増殖を最大にするように制御されているとは限らない。実際にある一定の培養条件において、解糖系からTCA回路までの代謝フラックスを理論的に最大にする各酵素の発現量は不明である。そこで、解糖系・TCA回路に酵素遺伝子発現を、その発現強度が任意に調整可能なプロモーター制御下に再構成することで各酵素の発現強度を変動させ、菌体増殖および代謝フラックス容量が最大となる酵素発現プロファイルを明らかにする。ただし、この手法では、例えば菌体増殖もしてくは代謝フラックスが増大したとしても、過剰に代謝酵素を発現するような状況では、酵素発現に要するエネルギーやアミノ酸生産も増大すると考えられるため、目的物質生産の収率の低下を招く恐れがある。そこで、各酵素の変異体ライブラリをランダム変異導入によって作製し、これらを各代謝酵素の欠損株に対して恒常的酵素発現を示す1コピープラスミドによって導入し、遺伝子欠損に伴う菌体増殖阻害の復帰率を指標としてスクリーニングすることで、低発現量でも高い代謝活性を示す「炭素中央代謝高活性酵素ライブラリ」の構築に並行して取り組む。それぞれの手法で得られた変異体を宿主として、上述した代謝トグルスイッチライブラリを導入し、標的代謝経路の遮断に伴う前駆物質の細胞内濃度の変

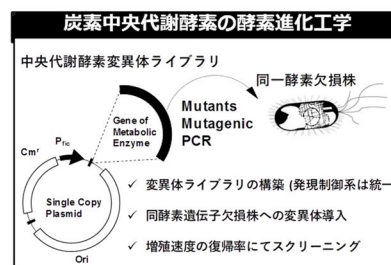


図4. 炭素中央代謝酵素の進化学

動をモニタリングする。

#### 4. 研究成果

本研究では、様々な基幹中間代謝物由来の有用化合物生産に適用可能な「代謝トグルスイッチライブラリ」を構築するとともに、これらを実装した大腸の最大増殖速度を向上させるための「実験室適応進化 (Adoptive Laboratory Evolution; ALE)」を実施し継代回数に伴って比増殖速度の増大が確認された菌株に対してメタボローム解析による代謝ネットワーク解析を実施した。その結果、炭素中心代謝経路のいくつかの代謝経路において活性亢進が確認された。また、各酵素の変異体ライブラリをランダム変異導入によって作製し、各代謝酵素の欠損株に対して恒常的酵素発現を示す 1 コピープラスミドによって導入して低発現量でも高い代謝活性を示す「炭素中央代謝高活性酵素ライブラリ」の構築に並行して取り組み、ライブラリからの有力な変異体のスクリーニングし、同じくメタボローム解析による代謝ネットワーク解析を実施した。その結果、有力株ではタンパク質合成不可の軽減に起因すると考えられるアミノ酸レベルが向上していることが明らかになった。現在までに、申請当初は完全に実証できていなかった研究・実験コンセプトが実証された。本研究では、「実験室適応進化 (Adoptive Laboratory Evolution; ALE)」と「炭素中央代謝高活性酵素ライブラリ」の構築が並行して進行している。何れも当初の仮設が実証されており、狙いどおりに研究課題は進行しており、一定の成果が挙がっている。現在、その成果をより汎用性の高いものに発展させるために引き続き研究が進行している。

また、代謝制御素子として構築したである代謝トグルスイッチ、および菌体密度感知センサーである合成クオラムセンシング (QS) などの従来の合成生物学的代謝工学ツールの改良にも並行して取り組んだ。発散型のシグナル伝達機構である従来のクオラムセンシングにネガティブ・フィードバック機構を導入することで、QS 依存的なシグナル伝達の感度と伝達強度を安定化させ、遺伝子誘導タイミングの違いによらず一定の出力強度を維持可能な QS を構築することに成功した (図 6)。この改変 QS を用いることで、TCA 回路の活性の ON/OFF を周期的に自動制御し、流加培養

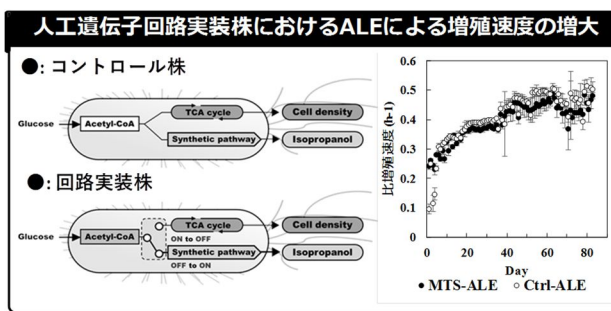


図 5. 人工遺伝子回路実装株の実験室適応進化

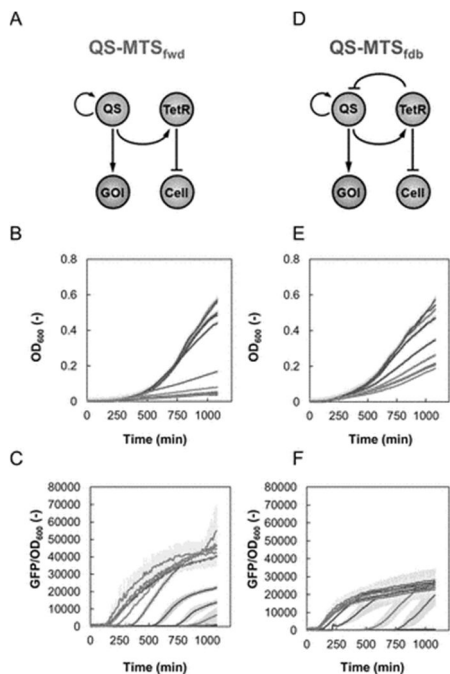


図 6. 改変 QS の回路動特性

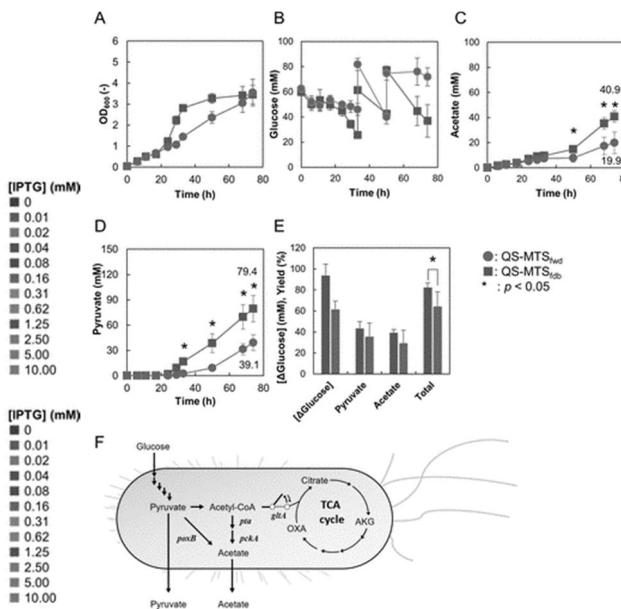


図 7. 改変 QS による流加培養発酵能の改善

Soma, Yuki, *et al.* "Design of synthetic quorum sensing achieving induction timing-independent signal stabilization for dynamic metabolic engineering of *E. coli*." *ACS Synthetic Biology* 10.6 (2021): 1384-1393.

の様な長期バイオプロセスにおいても代謝トグルスイッチの有効性を発揮させることに成功した (図 7)。

今後は、各種菌体の代謝状態・表現型の変動を詳細に評価し、動的な遺伝子発現制御を摂動とする際の代謝状態への影響を評価することで、バイオプロセスの各過程に適切な表現型を実

現するために必要な代謝改変方策を探索し、これに基づいて逐次的な回路の再設計を実施するとともに、実験室進化プロセスにおける代謝動態制御ネットワークのリプログラムの過程の解明に取り組む。また、引き続き低発現量でも高い代謝活性を示す「炭素中央代謝高活性酵素ライブラリ」の構築に並行して取り組む。それぞれの手法で得られた変異体を宿主として、上述した代謝トグルスイッチライブラリを導入し、メタボローム解析によって標的代謝経路の遮断に伴う各前駆物質の細胞内濃度の変動をモニタリングする。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hata Kosuke, Soma Yuki, Yamashita Toshiyuki, Takahashi Masatomo, Sugitate Kuniyo, Serino Takeshi, Miyagawa Hiromi, Suzuki Kenichi, Yamada Kayoko, Kawamukai Takatomo, Shiota Teruhisa, Izumi Yoshihiro, Bamba Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Calibration-Curve-Locking Database for Semi-Quantitative Metabolomics by Gas Chromatography/Mass Spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 207 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo11040207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chen Yan-Yu, Soma Yuki, Ishikawa Masahito, Takahashi Masatomo, Izumi Yoshihiro, Bamba Takeshi, Hori Katsutoshi	4. 巻 330
2. 論文標題 Metabolic alteration of <i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath during a microbial gas-phase reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioresource Technology	6. 最初と最後の頁 125002 ~ 125002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biortech.2021.125002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honjo, H., Iwasaki, K. (co-first author), Soma, Y., Tsuruno, K., Hamada, H., Hanai, T.	4. 巻 55
2. 論文標題 Synthetic microbial consortium with specific roles designated by genetic circuits for cooperative chemical production.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Metab. Eng.	6. 最初と最後の頁 268-275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymben.2019.08.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirokawa, Y., Kubo, T. (co-first author), Soma, Y., Saruta, F., Hanai, T.	4. 巻 57
2. 論文標題 Enhancement of acetyl-CoA flux for photosynthetic chemical production by pyruvate dehydrogenase complex overexpression in <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metab. Eng.	6. 最初と最後の頁 23-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymben.2019.07.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岩崎 達史朗 <sup>1</sup> , 本庄 宏 <sup>1</sup> , 相馬 悠希 <sup>2</sup> , 鶴野 圭悟 <sup>1</sup> , 盧 鎮栄 <sup>1</sup> , 濱田 浩幸 <sup>1</sup> , 花井 泰三 <sup>1</sup>
2. 発表標題 異なる人工遺伝子回路持つ二つの大腸菌による共培養系の構築
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬 悠希 <sup>1,2</sup> , 藤原 由梨 <sup>2</sup> , 高橋 政友 <sup>1</sup> , 後藤 麻衣子 <sup>1</sup> , 下平 武彦 <sup>1</sup> , 池田 明夏里 <sup>3</sup> , 寺内 勉 <sup>3</sup> , 和泉 自泰 <sup>1,2</sup> , 馬場 健史 <sup>1,2</sup>
2. 発表標題 次世代定量メタボローム解析に資する安定同位体標識内部標準品群調製法の開発
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田 良美 <sup>1</sup> , 下平 武彦 <sup>2</sup> , 相馬 悠希 <sup>2</sup> , 和泉 自泰 <sup>2</sup> , 安藤 晃規 <sup>1</sup> , 岸野 重信 <sup>1</sup> , 阪本 鷹行 <sup>3</sup> , 馬場 健史 <sup>2</sup> , 小川 順 <sup>1</sup> , 櫻谷 英治 <sup>3</sup>
2. 発表標題 油糧糸状菌 <i>Mortierella alpina</i> の分子育種による遊離脂肪酸生産株のリピドーム解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相馬 悠希, 篠原 玉樹, 藤原 由梨, 角田 一真, 秦 康祐, 和泉 自泰, 花井 泰三, 馬場 健史
2. 発表標題 代謝動態制御を介して菌体集団規模を制御するQuorum Sensing型遺伝子回路の構築とメタボローム解析による機能評価
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原由梨, 相馬悠希, 高橋政友, 和泉自泰, 馬場健史
2. 発表標題 絶対定量メタボローム解析の実用化に向けた安定同位体内部標準群のバイオプロダクション
3. 学会等名 第25回日本生物工学会 九州支部鹿児島大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Soma, Yuri Fujiwara, Kohsuke Hata, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba, Taizo Hanai.
2. 発表標題 Dynamic metabolic engineering harnessing synthetic biological tools and metabolomic analysis
3. 学会等名 Metabolic Engineering 12 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Soma
2. 発表標題 Design of Microbial Cell Factories with Dynamic Gene Regulation
3. 学会等名 The Asian Synthetic Biology Association (ASBA 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 質量分析用標識組成物, 代謝物の定量分析法, 及び代謝物の動態解析法	発明者 脇村明夏里, 寺内 勉, 馬場健史, 和泉 自泰, 相馬悠希	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-090121	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 標識代謝物の製造方法、代謝物の定量方法、及び標識代謝物製造キット	発明者 寺内 勉, 脇村 明夏 里, 馬場 健史, 和泉 自泰, 相馬 悠希	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2019-24326	出願年 2018年	国内・外国の別 国内



〔取得〕 計0件

〔その他〕

Google Scholar  
<https://scholar.google.com/citations?user=tqoJYggAAAAJ&hl=en>  
研究者プロファイリングツール 九州大学Pure  
<https://kyushu-u.pure.elsevier.com/ja/persons/yuki-soma>  
個人HP  
<https://y-soma.wixsite.com/home>  
<https://y-soma.wixsite.com/home>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------