

モデルベース設計を基盤とした指向性進化による高効率細胞 プロセス創製の確立と展開

High performance microbial cell factories development
by model based metabolic design and adaptive laboratory
evolution

課題番号：19H05626

清水 浩（SHIMIZU Hiroshi）

大阪大学・大学院情報科学研究科・教授



研究の概要（4行以内）

持続可能な社会の形成を目指して、微生物の代謝変換による化成品・燃料の製造が注目されている。本研究では、目的物質生産に最適な細胞を構築するため、増殖と連動して目的物質を生産する代謝経路を持つ細胞を開発する。また、指向性進化を組み合わせることで、代謝反応を駆動する際の障壁となる律速点を抽出・解消し、代謝状態を自在に誘導する手法を確立する。

研究分野：バイオ機能応用およびバイオプロセス工学関連

キーワード：代謝工学・ゲノムスケールモデル・指向性進化・ロボット・マイクロリアクタ

1. 研究開始当初の背景

微生物を用いた物質生産は環境調和型のものづくりとして期待されている一方で、その生産性の低さが問題となっている。また、従来熟練研究者の経験に基づいて行われていた菌株の改良の効率化、高度化が必要である。ゲノムワイドな代謝モデルの構築やオミクス解析を援用した有用物質生産が進められているが、代謝経路に潜む律速点の効果的な抽出と解消の方法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究においては、ゲノムワイドに代謝をシミュレーションできる①ゲノムスケールモデルを用いて代謝を *in silico* デザインし、②ロボットや③マイクロ流路による指向性進化を行って生産株の増殖や生産の能力を進化させることで優良な生産微生物を構築する手法を確立することを目的とする。また、④代謝経路内に潜んでいる物質生産の律速点を抽出し解消する方法を開発する。これらの研究成果を統合することで、⑤プロセス開発および⑥代謝を自在に利用して高効率生産細胞を創製する手法を確立する。

3. 研究の方法

本研究においては、微生物の代謝がゲノムワイドに解析可能なゲノムスケールモデルを構築し、物質生産のための代謝を計算機援用によってデザインする方法を開発する。複

数の目的物質を設定し、実際にデザインされた菌株を構築して生産性を評価することでシミュレーションと実際の代謝の差異を明らかにする。次に、ロボットやマイクロ流路による多系列植え継ぎ培養を用いて、デザインされた生産用親株を適応進化させ、細胞の増殖と生産性を連動して向上させた進化株を取得する。全ゲノムシーケンシング、代謝フラックス解析を行って親株と進化株を比較することで、代謝経路に潜む律速点の同定と解除を行い、代謝の調節メカニズムを解明する。これらの情報を統合し、合理的な物質生産プロセスを開発する手法を開発する。

4. これまでの成果

① *in silico* 代謝デザイン・育種

細胞内の代謝の流れ（フラックス）を統一的に計算機で扱えるよう情報を整理し、目的物質を高収率で生産可能な代謝経路を設計する方法を開発した。ゲノムスケールモデルを構築し、代謝フラックスバランス解析法を実施するための環境を整備した。生産デザインは増殖連動型として行った。大腸菌の中核代謝において取り込む栄養源（材料）、生産する標的化合物をそれぞれ複数設定し、環境変化、遺伝子導入・削除によってもたらされるそれぞれの物質生産を行うため、遺伝子破壊による代謝デザインを行った。図1にデザインの結果を示す。得られたデザインを大腸菌に実装し、親株のセットを構築した。

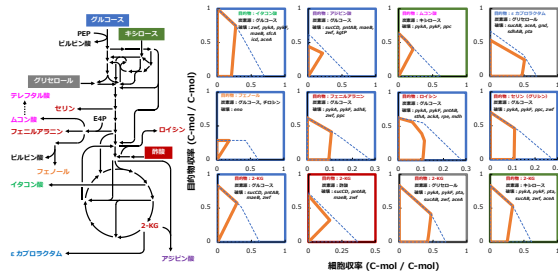


図 1. 化学物質生産のための代謝デザイン

②ロボットによる実験進化

指向性進化によって、増殖速度が上昇した進化株を取得した。植え継ぎを多系列で行うためのロボットを開発した(図2)。ロボット開発においては、全自動で細胞濃度測定、培地の交換を行うことが可能なシステムを導入し、実験室進化を行わせる方法を開発した。得られた多系列の進化株の表現型や遺伝子発現解析を行うマルチオミクス解析法も開発した。

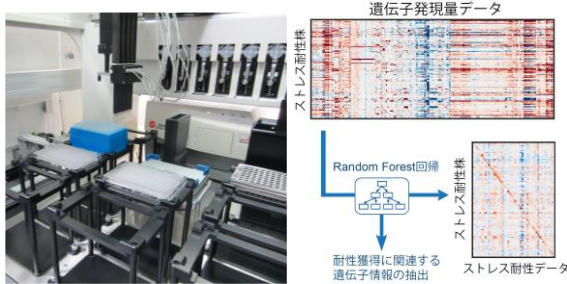


図 2. 多系列自動培養ロボットと情報解析

③マイクロ流路連続培養系の開発

異なる選択圧での進化実験を行うため、マイクロ流路や油中水滴による培養系を開発した(図3)。マイクロ流路による細胞培養リアクタを開発し、細胞の形状や増殖を監視しながら培養を安定に行えるシステムの開発を行うことにも成功した。これらのシステムを用いて、増殖や生産能力の低い株を進化させるためのシステム開発が整った。

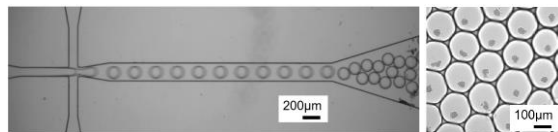


図 3. マイクロ流路培養システムの開発

④進化株の評価と機能解析

デザインされた物質生産株(親株)を指向性進化実験に供したところ、増殖や生産性の高い進化株を複数系列にわたって独立に取得することに成功した。すべての系列で得られた進化株を次世代シーケンサーにより全ゲノムシーケンズ解析を行ったところ、独立して得られた進化株に共通する遺伝子変異が同定された。ゲノム編集技術を利用して、共通した変異を親株に導入したところ、進化株と同様の増殖、生産能力を示したため、

得られた共通変異は増殖や生産のために律速となっていた制限を解消し、高い生産能力を有する株が取得できたと考えている。この菌株は外部から前駆体を取り込ませる形で代謝デザインしたが進化株においてはその取り込み能力が上昇することが分かり、律速点の抽出と解消を可能とする方法としての有効性が確認できた。

5. 今後の計画

④から⑥の研究を計画通り実施する。得られた進化株のゲノムリシーケンスと¹³C代謝フラックス解析を行うことによって、ゲノムに挿入された変異が代謝や表現型に及ぼす影響について解析を行う。得られる情報を統合し、代謝経路に潜む律速点を網羅的に抽出し、その解消のメカニズムを解明する。これにより、目的に物質生産に対して自在に代謝経路を改変するための方法として完成させていく。さらに物質生産に適したプロセス開発を行う。また、複数の化合物に対する進化、異なる選択圧で生じた進化過程を追うことで、与えられた遺伝的背景や環境に対して細胞がどのような方向性で代謝を変化させていくのかのメカニズムに迫る。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Maeda, T, Horinouchi, T, *Furusawa, C., ら(著者9名) High-throughput laboratory evolution reveals evolutionary constraints in *Escherichia coli*, *Nature Communications*, **11**, 5970 (2020) (査読有)
2. Toya, Y., *Shimizu, H., Flux controlling technology for central carbon metabolism for efficient microbial bio-production, *Curr Opin Biotech*, **64**, 169-174(2020) (査読有)
3. Horinouchi, T., Maeda, T., *Furusawa, C., Suppression of antibiotic resistance evolution by single-gene deletion, *Sci Rep*, **10**, 4178 (2020) (査読有)
4. Nochino, N., Toya, Y., *Shimizu H., Transcription factor ArcA is a flux sensor for the oxygen consumption rate in *Escherichia coli*, *Biotech Jour*, **15**(6), e1900353 (2020) (査読有)
5. Horinouchi, T., *Furusawa, C. Understanding metabolic adaptation by using bacterial laboratory evolution and trans-omics analysis, *Biophys Rev*, **12**(3), 677-682 (2020) (査読有)
他5編

7. ホームページ等

<http://www-shimizu.ist.osaka-u.ac.jp/hp/index.html>