

令和元年5月14日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04576

研究課題名(和文) 多層階の動的代謝解析による律速点同定とフラックス最適化法の開発

研究課題名(英文) Identification of Limiting Step and Optimization of Metabolism based on Analysis of Dynamic Behaviors of Multilayers Omics Data

研究代表者

清水 浩 (SHIMIZU, Hiroshi)

大阪大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：00226250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：微生物による有用物質生産を実現するには、微生物が有する代謝系を合理的に改変し、生産収率および生産速度の両方を最大化する必要がある。本研究では、微生物生産における生産速度の向上に焦点を当て、代謝経路中に潜む律速点を同定する方法について研究を行った。質量分析計を用いた¹³C標識代謝フラックス解析、酵素タンパク質定量、代謝物質絶対定量法の開発を進め、細胞内の代謝状態を高度に定量精密解析する基盤を整えた。また、代謝状態の実測データをもとに非平衡熱力学的手法の導入、および、代謝反応速度論モデルの構築により、目的物質の律速点の同定と解除に基づく生産速度の最適化法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物細胞の代謝は多段階の化学反応であり、微生物生体触媒として用いることで、一つのプロセスによって原料を目的物質に変換することが可能である。しかし、多段階の反応が関与するため、どこにその律速点が存在するのかを知ることは容易ではない。微生物の代謝フラックス解析、酵素タンパク質定量、代謝物質絶対値を解析し、熱力学的手法の導入や代謝反応速度論モデルの利用によって代謝の律速点をシステムティックに抽出し効率的に遺伝子操作の戦略を提案できるシステムを開発したところに大きな意義がある。大腸菌のメバロン酸生産に適用することで、その有効性への道筋を示している。

研究成果の概要(英文)：In microbial production system, it is important to rationally improve microbial metabolism and optimize production yield and production rate. In this study, we mainly focused on the improvement of production rate. We tried to develop a systematic method to extract limiting steps in the metabolic pathway. Precise analytical methods of metabolism, ¹³C-metabolic flux analysis, quantitation of proteins related to metabolism, and absolute quantitation of metabolite concentrations were conducted. These analytical data was used for thermodynamics analysis and kinetic modeling. Limiting steps in the central carbon metabolism of Escherichia coli was successfully identified and target production improvement was realized by designed genetic modification of the cells.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：反応速度論 物質生産 インシリコデザイン 代謝フラックス 生物情報工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物による有用物質生産を実現するには、微生物が有する代謝系を合理的に改変し、生産収率および生産速度の両方を最大化する必要がある。我々の研究グループではこれまでに、生産収率に着目した代謝の計算機を援用した (*in silico*) 代謝改変のデザイン法の開発を行ない、糖原料から目的物質への生産収率を向上させる合理的な微生物細胞工場創製法へと展開してきた。この方法で見いだした遺伝子の最適改変戦略を大腸菌に適用することで、目的物質生産の収率を大きく向上させることに成功し、その有効性を実証してきた。

これらの研究から明らかとなった課題は、収率の向上に加え、「代謝の律速点を同定し、生産速度を向上させる方法が未開発」ということである。例えば遺伝子の最適改変戦略をもとに作成した大腸菌においても、生産速度には改善の余地が多く残されている。これは未知の律速点により代謝流量 (フラックス) が最大化されていないためであり、多段にわたる代謝系の中に潜む律速点を同定する方法が必要とされている。化学プロセスの感度解析研究では、プロセスの反応速度論モデルを作成し、そのモデルを利用して、目的物質の生産性上昇に寄与するパラメータ (触媒量等) を同定する。つまり代謝の律速点を同定し、酵素発現量を調整して生産速度を向上させるには、代謝物質濃度、酵素量を加味した代謝反応速度論モデルを構築し、律速点を同定する新たな *in silico* 代謝解析システムの構築と遺伝子発現の実験的改良を一体化した代謝デザインフレームワークの開発 (図1) が必要と考えた。

このアプローチがバイオプロセスでこれまで一般化しなかった理由は、反応速度論モデルの構築に用いる細胞内 (*in vivo*) 酵素反応パラメーターの推定に必要な、代謝状態の実測データが不足していた点にある。そこで、我々のグループでは質量分析計を用いた ¹³C 標識代謝フラックス解析、酵素タンパク質定量、代謝物質絶対定量法の開発を進め、*in vivo* の代謝状態を高精度に定量精密解析する基盤を整えた。そこで本研究では、代謝状態の実測データをもとに代謝反応速度論モデルの構築法を開発し、目的物質の「収率」の改良にとどまっていた代謝デザイン法を、律速点の同定と解除に基づく「生産速度」最適化に深化させることを目的とした。



図1: 実測データから代謝速度論モデルを構築し、律速点を同定する *in silico* 代謝デザインフレームワーク

2. 研究の目的

本研究では、上記のような背景をもとに、これまで困難だった微生物細胞内代謝反応プロセスの生産速度を向上させるための方法論を下記の項目にわたって開発することを目的とした。例として大腸菌によるメバロン酸やコハク酸生産をベンチマークとして研究開発を行なうこととした。

細胞内の代謝物質濃度、代謝フラックス、酵素量など代謝状態の正確に示す実測データを収集し、このデータを説明するための代謝速度論モデルの構築、および酵素発現量の変化が目的物質生産速度に与える影響の大きさを調べる方法の確立を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1) *in vivo* 酵素反応パラメーター推定のための代謝定量解析法の確立

代謝定量解析法を行うために、炭素中心代謝経路における代謝フラックス、代謝物質濃度、およびタンパク質濃度定量法を確立し *in vivo* 酵素反応パラメーターを推定するための分析基盤を構築する。

2) 代謝定量データの取得と代謝律速点候補の絞り込み法の開発

メバロン酸生産大腸菌を複数の条件下で培養し、中心代謝の代謝物質濃度、酵素量、代謝フラックスデータを取得する。さらに、代謝物質の濃度プロファイルを用いて非平衡熱力学解析を行い、代謝反応の化学平衡状態からの距離、反応の方向性を定量的に検討し、代謝経路中の律速点の候補を絞り込む。

3) ゲノムワイドな代謝モデルを用いた代謝改良との比較

代謝改良のために用いられるゲノムワイドな代謝モデルや代謝フラックスバランス法を用いた代謝改良デザインの手法を行って、律速点抽出における手法の比較を行った。

4) 代謝反応速度論モデルの自動構築および高精度感度解析法の開発

代謝反応速度論モデルを作成するための基礎検討およびソフトウェアの開発を行なう。不確定要素の大きい代謝系のモデリングを効率的に行なうために、まず、代謝反応速度論モデルの酵素反応式の記述法を検討した。ついで代謝定量解析データを用いて、代謝反応速度モデルの酵素反応パラメーターを学習し、予測力を向上させる方法を検討した。さらに、代謝律速点を

解除するための遺伝子操作デザインを行う。多数の反応速度論モデルを用いた感度解析結果から律速点を同定する手法を開発を行った。

4. 研究成果

1) 代謝定量解析法の確立

^{13}C 標識同位体を細胞に取り込ませて ^{13}C 標識同位体がどのような割合で代謝物質に存在するのかをガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) 決定し、細胞が取り込んだり、排出する代謝フラックスを加味して細胞の代謝フラックスが決定できるシステムを開発した。我々のグループで開発した代謝フラックス決定用のソフトウェアを用い大腸菌の代謝フラックスが決定できることを確認した。メバロン酸生産(Wada 2016, Masuda 2017)やその他の化合物(2017 Okahashi)生産大腸菌の代謝フラックスが高精度に決定することが可能で遺伝子操作の代謝に与える影響について定量的に議論する基盤が確立した。また、 ^{13}C 標識グルコースを単一炭素源として培養した細胞から ^{13}C 標識内部標準代謝物質を調製することで、LC-MS/MS を用いて炭素中心代謝の中間体の絶対定量を実現した。大腸菌の中心代謝中間体の絶対定量を行った。さらに、酵素タンパク質はナノ LC-MS/MS を用いた定量プロテオミクス法で定量する方法を確立した。これにより、大腸菌の *in vivo* 酵素反応を決定するために必要な基礎データ、代謝物質量、代謝フラックス、タンパク質量を同じ細胞から取得する方法を確立した。

2) 代謝定量データの取得と代謝律速点候補の絞り込み法の開発

1) の項目で代謝物質の濃度プロファイルが得られるため、代謝律速点候補の絞り込みを行なう方法として非平衡熱力学を基盤とする方法に取り組んだ。細胞の代謝系は外界から栄養を取り込み、多段の反応を経て、系外へと排出し続ける非平衡熱力学系と考えることができる (Hatzimanikatis, *Biophys J*, 2004)。そこで、絶対定量された代謝物質濃度を用いて、各代謝反応の反応物と生成物の濃度勾配を解析し、さらに Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG を決定することを試みた。標準自由エネルギー ΔG^0 はデータベースを参照しその値を用いた。Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG がゼロに近い反応は、化学平衡に近い状態にあり、酵素量が律速の原因になっている可能性は低い。一方、Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG が大きく負になっている反応では、酵素量が反応速度の律速になっている可能性がある。この結果から、代謝律速点候補の絞り込みを試みる。代謝律速点候補をあらかじめ絞り込むことで、代謝モデルの構築や、感度解析を効率的に進めることが可能となると考えた。これらのデータをもとに律速点を抽出し、遺伝子発現量を変化させたところ、メバロン酸生産速度の向上が認められた(Nagai, et al. 2018)。

3) ゲノムワイドな代謝モデルを用いた代謝改良との比較

ゲノムワイドな代謝解析法としてゲノムスケールモデルを用いたフラックスバランス解析法 (FBA) がある。この方法は、代謝物質濃度、代謝フラックス量などの実験地を必要としない簡便かつ網羅的な方法である。しかし、その一方で、代謝の酵素反応速度パラメーターを無視するために代謝物質とタンパク質の相互作用などの情報を取り込むことができず、予測された代謝改良を行っても予測された生産量を達成できない場合も多いのではないかと考えられる。ここでは、ゲノムワイドな代謝解析を行って大腸菌によるコハク酸生産量を向上させることを試みた。コハク酸を生産させるために多重遺伝子破壊をデザインし、実装したところ効果はあったが、その生産量は予測された量と比較して十分高いものではなかった。そこで、進化実験を行って増殖と連動した生産性の向上を試みたところ、増殖と生産量がシミュレーションに近い値を示す量に上昇した。ゲノムリシークエンス、酵素学的解析を重ねたところ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ反応が律速となっており、進化実験によってその律速点が解除されたことが明らかになった。ゲノムワイドな化学量論による収率の最適化方法には細胞全体の遺伝子を見渡すことができるが、代謝物質とタンパク質の相互作用を考慮することが律速点抽出には重要であることが明らかとなった (Tokuyama, et al., 2018)。

4) 代謝反応速度論モデルの構築および高精度感度解析法の開発

化学量論を扱うだけでは代謝律速点をシステムティックに抽出することは難しい場合があることが分かったので、本研究では、化学量論と酵素反応速度式から構成された動的モデルを導入し、代謝物質濃度や酵素量などの要素を取り組むこととした。動的モデルの構築には、反応ごとの速度式とミカエリスメンテン定数や反応速度定数などの酵素反応パラメーターが必要である。これまでに *in vitro* で測定した酵素活性を基に酵母の動的モデルが構築されたが、*in vivo* 測定とモデル予測との間に相違があり、*in vitro* 由来モデルでは *in vivo* の挙動を適切に予測できないことも報告されている。

本研究では、アンサンブルモデリング法を用いた動的代謝モデルを導入した。この手法では、代謝フラックス分布と代謝物濃度の測定値を満たす酵素反応パラメーターをランダムに生成する。ランダム生成ではパラメーターセットを一意に決めるのではなく、パラメーターセットが異なり、同じ表現型を満たすモデルの集合体「アンサンブル」を生成する。生成したモデルのアンサンブルを用いて、実験データを説明するアンサンブルから遺伝子改変株の代謝の変化が予測可能となり、また、これを繰り返し用いることで遺伝子改変株の表現型を精度よく予測で

きたモデルを保存することで、予測精度の高いモデルを抽出できる。本研究では、中枢代謝における物質生産大腸菌のアンサンブルモデルを生成し、その戦略立案の道筋が明らかとなった。

5) まとめ

大腸菌の代謝物質生産における代謝改変において、代謝物質、代謝フラックス、タンパク質量を正しくとらえる方法の開発を行った。その結果、さまざまな物質生産に適用可能であり、代謝物質濃度を利用した Gibbs 自由エネルギー変化化から代謝律速点を明らかにする方法の開発に成功した。また、中枢代謝の代謝物質濃度とタンパク質の相互作用を含めた動的アンサンブルモデルを開発しよりシステマティックな代謝律速点の抽出に対する足掛かりを提示することが可能となった。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 10 件)

Kento Tokuyama, Yoshihiro Toya, Fumio Matsuda, Brady Cress, Mattheos A. G. Koffas, Hiroshi Shimizu, Magnesium starvation improves production of malonyl-CoA-derived metabolites in *Escherichia coli*, **Metabolic Engineering**, 査読有, Vol.52, 2019, 215-223, DOI:10.1016/j.ymben.2018.12.002

清水浩, 計算機工学に基づく代謝設計とその有効性の実証に関する研究、生物工学誌、査読有, Vol.97, 2019, 13-20

https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9701/9701_koseki.pdf

Hikaru Nagai, Ami Masuda, Yoshihiro Toya, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, Metabolic engineering of a mevalonate-producing *Escherichia coli* strain based on thermodynamic analysis, **Metabolic Engineering**, 査読有, Vol.47, 2018, 1-9, DOI:10.1016/j.ymben.2018.02.012

Kento Tokuyama, Yoshihiro Toya, Takaaki Horinouchi, Chikara Furusawa, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, Application of adaptive laboratory evolution to overcome a flux limitation in an *Escherichia coli* production strain, **Biotechnology and Bioengineering**, 査読有, Vol.115, 2018, 1542-1551, DOI:10.1002/bit.26568

Yoshihiro Toya, Shugo Ohashi, Hiroshi Shimizu, Optimal ¹³C-labeling of glycerol carbon source for precise flux estimation in *Escherichia coli*, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 査読有, Vol.125, 2018, 301-305, DOI:10.1016/j.jbiosc.2017.09.009

Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda, Katsunori Yoshikawa, Tomokazu Shirai, Yoshiko Matsumoto, Mitsufumi Wada, Hiroshi Shimizu, Metabolic engineering of isopropyl alcohol-producing *Escherichia coli* strains with ¹³C-metabolic flux analysis, **Biotechnology and Bioengineering**, 査読有, Vol.114, 2017, 2782-2793, DOI:10.1002/bit.26390

Ami Masuda, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu, Metabolic impact of nutrient starvation in mevalonate-producing *Escherichia coli*, **Bioresource Technology**, 査読有, Vol.245, 2017, 1634-1640, DOI:10.1016/j.biortech.2017.04.110

Fumio Matsuda, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu, Learning from quantitative data to understand central carbon metabolism, **Biotechnology Advances**, 査読有, Vol.35, 2017, 971-980, DOI:10.1016/j.biotechadv.2017.09.006

Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu, Recent advances in amino acid production by microbial cells, *Current Opinion in Biotechnology*, 査読有, Vol.42, 2016, 133–146, DOI:10.1016/j.copbio.2016.04.017

Keisuke Wada, Yoshihiro Toya, Satomi Banno, Katsunori Yoshikawa, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, ¹³C-metabolic flux analysis for mevalonate producing *Escherichia coli*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, Vol.123, 2016, 177-182, DOI:10.1016/j.jbiosc.2016.08.001

[学会発表] (計 9 件)

Kento Tokuyama, Yoshihiro Toya, Takaaki Horinouchi, Chikara Furusawa, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, Expanding the space of actual metabolic network in *Escherichia coli* by adaptive laboratory evolution, *Metabolic Engineering 12*, 2018

Keisuke Wada, Kiyoka Uebayashi, Yoshihiro Toya, Yudai Dempo, Sastia Putri., Fumio Matsuda, Eiichiro Fukusaki, James Liao, Hiroshi Shimizu, Isotopically non-stationary ¹³C-metabolic flux analysis of n-butanol production in *Synechococcus elongates*, *i-BioP2016*, 2016

清水浩、微生物バイオプロセスにおける計測と育種・プロセス開発への展開、日本生物工学会バイオ計測サイエンス研究部会第一回シンポジウム、2018

清水浩、徳山健斗、戸谷吉博、松田史生、増殖連動型物質生産の in silico 解析における反応律速点の同定法の開発と実験検証、化学工学会第 50 回秋季大会、2018

清水浩、計算機工学に基づく代謝設計とその有効性の実証に関する研究、第 70 回日本生物工学会大会 生物工学功績賞受賞講演、2018

北村さや香、戸谷吉博、清水浩、フェノールが大腸菌の中核代謝に及ぼす影響の解析、第 70 回日本生物工学会大会、2018

北村さや香、戸谷吉博、清水浩、代謝工学に基づく大腸菌フェノール生産株の育種、化学工学会第 83 年会、2018

清水浩、松田史生、戸谷吉博、岡橋伸幸、前田昂亮、¹³C 代謝フラックス解析による細胞の生理状態の理解と工学応用、化学工学会第 49 回秋季大会、2017

徳山 健斗、戸谷 吉博、清水 浩、in silico 代謝設計と実験室進化実験の統合によるコハク酸高生産大腸菌の構築、化学工学会第 48 回秋季大会、2016

[図書] (計 2 件)

Hiroshi Shimizu, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa, Katsunori Yoshikawa, Yoshihiro Toya, Tomokazu Shirai, Fumio Matsuda, *Wiley-VCH, BIOTECHNOLOGY*, Wiley-VCH book series, Weinheim, Vol 5: Applied Bioengineering: Innovations and Future Directions, Chapter 7, Omics integrations for the state analysis of microbial processes, 2017, pp.201-236(36P)

Kazuyuki Shimizu, Hiroshi Shimizu, Toshiomi Yoshida, *Wiley-VCH, BIOTECHNOLOGY*, Wiley-VCH book series, Weinheim, Vol 5: Applied Bioengineering: Innovations and Future Directions, Chapter 8, Control of Microbial Processes, 2017, pp. 237- 258(22P)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 松田 史生

ローマ字氏名: Matsuda Fumio

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 情報科学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 50462734

研究分担者氏名: 戸谷 吉博

ローマ字氏名: Toya Yoshihiro

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 情報科学研究科

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 70582162

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。