

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14546

研究課題名（和文）人工合成細菌叢による高活性代謝システムの創出

研究課題名（英文）Development of a highly active metabolic system using synthetic microbial consortium

研究代表者

相馬 悠希（Soma, Yuki）

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：80781955

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、「相利共生型的人工合成細菌叢」の増殖速度を選抜指標とする革新的酵素スクリーニング法の開発に取り組んだ。単独では増殖できない遺伝子欠損株同士が代謝物を相互供与することで増殖可能となる相利共生型的人工合成細菌叢を構築した。このような細菌叢では、代謝物の相互供与の活性が高いほど細菌叢全体が「共増殖」する速度が高くなる特性があるため、代謝物の相互供与に寄与する酵素の活性の優劣を、細菌叢の「共増殖速度」で評価できる。いくつかのモデル細菌叢で代謝物相互供与を担う代謝酵素にランダム変異を導入した結果、野生型の細菌叢を上回る共増殖速度を示す変異型の細菌叢を獲得し、実際に酵素活性の向上が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素進化学において効率的に高活性酵素を獲得するには、全変異体数に対するスクリーニング系の網羅性とスループットが十分に高いことが求められる。本研究では、微生物培養液の濁度を計測するだけで簡便に標的酵素の活性を疑似的に評価する手法を開発した。これにより、プレートリーダーなどの既存設備を使用して省力・省コストでハイスループットな酵素活性スクリーニングを実現した。また、微生物の相利共生における代謝物の相互供与に関与する各種パラメータ（酵素活性・酵素発現量・菌体量比・供与代謝物利用における化学量論、等）を精密にコントロールすることで、菌叢としての表現型に与える影響を精細に解析することに成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a novel enzyme screening method employed “synthetic microbial consortium”, which facilitates enzyme activity assay using their growth rate as a selection index. We constructed a synthetic microbial consortium using amino acid auxotroph strains which can grow by mutually donating metabolites to each other. In such system, the higher the activity of mutual donation of metabolites, the higher the rate of “co-growth” of the entire consortium. And the superiority of the activity of enzymes that contribute to the mutual donation of metabolites can be evaluated by the “co-growth” of the consortium. By introducing random mutations into the metabolic enzymes responsible for metabolite co-donation in several model bacterial flora, we obtained mutant flora with a co-proliferation rate higher than that of the wild-type flora, and in fact, the improvement in enzyme activity was confirmed.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 代謝工学 進化学 細菌叢

1. 研究開始当初の背景

再生可能資源を原料に、微生物を用いたバイオプロセスによって様々な有用化成品を生産するバイオリファイナー研究が発達したが、実用化を果たした例は多くない。その要因の1つはバイオプロセス自体の非効率性にある。バイオプロセスの効率化を図るには、生産ユニットたる菌体数を確保しながら、生産ユニットあたりの生産効率である比生産性を最大化する必要がある。しかし、菌体増殖のための内在性代謝と目的化合物生産のための外因性代謝は、互いに共通の中間代謝物を要求する競合関係にあり、“菌体増殖型の表現型”と“目的化合物生産型の表現型”は事実上のトレードオフの関係にある。このような代謝基質の分配に依存する表現型の制約は「代謝不均衡：Metabolic Imbalance」と称され、バイオプロダクションにおける普遍的な課題として認知されてある<sup>1,2</sup>。近年、この代謝不均衡を解消するための戦略として、人工遺伝子回路や代謝物センサーを用いて標的酵素反応を局所的・動的に制御する「動的代謝工学：Dynamic metabolic engineering」が注目されている(図1)<sup>3,6</sup>。一方で、代謝不均衡を解消できたとしても、細胞が単位時間あたりに処理可能な代謝物(炭素源基質とその中間代謝物)の絶対量には限界がある。このような代謝能力の許容限界を「代謝絶対容量: Metabolic Absolute Capacity」と定義すると、「代謝不均衡」を解消する手法を開発しながら「代謝絶対容量」を拡張する革新的技術開発の両輪型の研究開発が必要な現状にある。

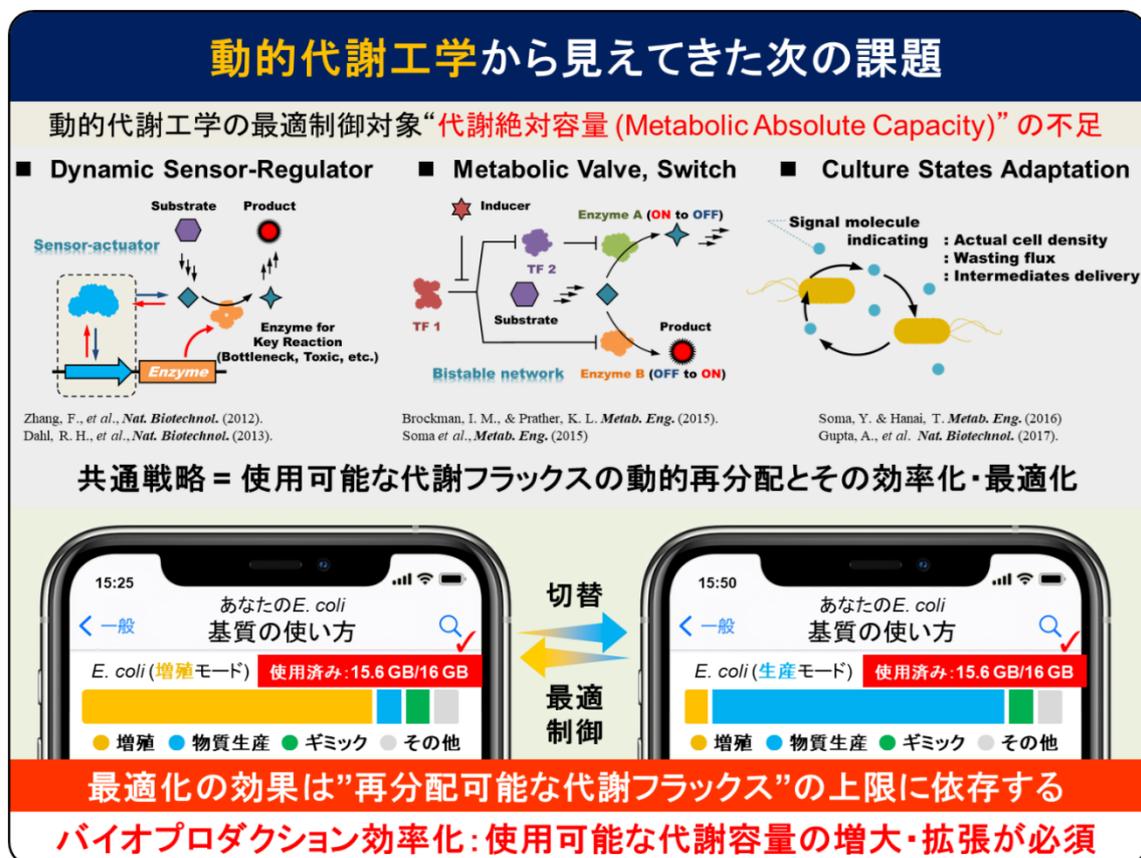


図 1. 研究背景：動的代謝工学戦略と未解決課題

本研究では、酵素進化学によって高活性代謝酵素を選抜し、内在性酵素と置き換えることで、内在性の代謝酵素発現コストを最小限に抑えながら高い代謝能力を発揮する「高活性代謝システム」の構築を目指す(図2)。酵素進化学における最大のボトルネックは変異体ライブラリの酵素活性評価であり、これまでも代謝物センサー・レポーター系や人工蛍光基質の利用などの様々な工夫がなされてきた。本研究では、大腸菌内在性酵素の進化学に適した新たな試みとして「人工合成細菌叢」による活性スクリーニング系の構築を目指す。

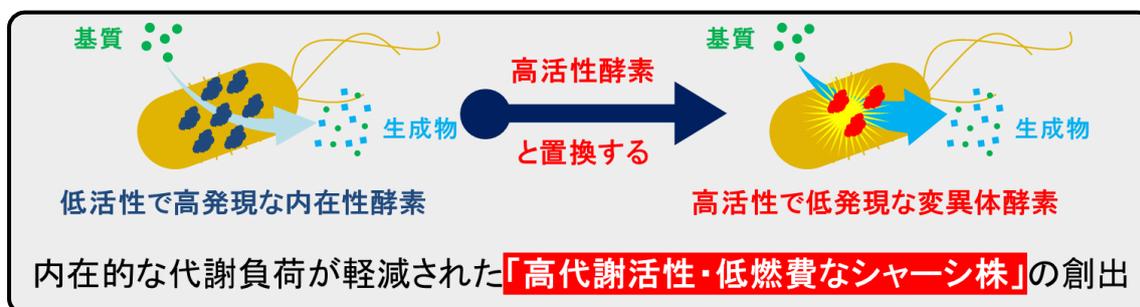


図2. 主幹代謝酵素の高活性化による代謝絶対容量の拡張

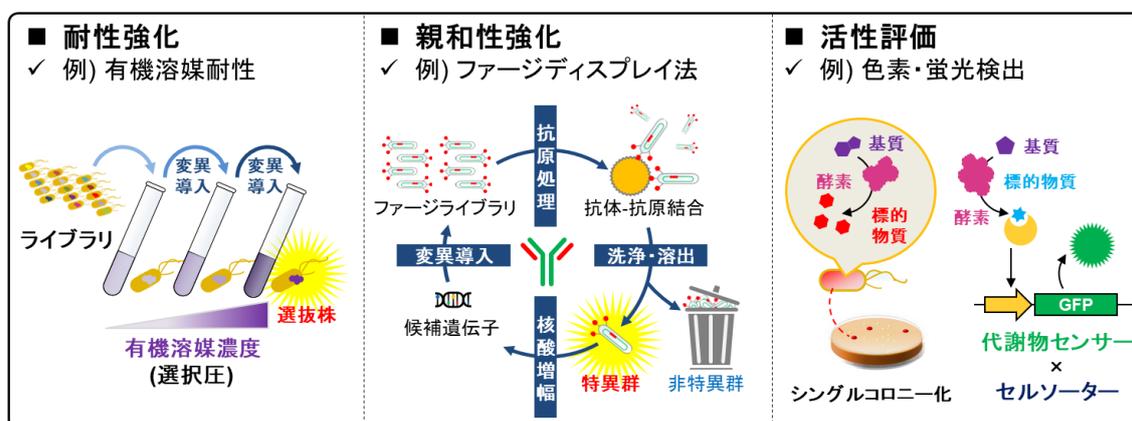


図3. 酵素進化学における合理的かつ効率的なスクリーニング系の設計

## 2. 研究の目的

本研究では、大腸菌内在性酵素の進化学に適した新たな試みとして「人工合成細菌叢」による活性スクリーニング系の構築を目的とした。標的酵素の活性が共依存関係にある細菌叢の増殖速度を支配する様な細菌叢をデザインすることで、菌体密度を高活性酵素の選抜指標に利用可能な汎用的なスクリーニング系を構築する。この方法では、相利共生微生物の増殖能を吸光度として計測するだけで標的酵素の活性変化を評価できる。そのため、計測スループットが非常に高く、汎用的かつ安価な装置で簡便に酵素活性評価が可能となる。

## 3. 研究の方法

微生物の代謝を一部欠損させ、他の大腸菌株がその代謝を相補することで成立する「代謝シェアリング」型の共養系は、相利共生型の人工合成細菌叢を形成する<sup>7</sup>。相利共生関係にある微生物において、代謝物の供与に関わる酵素遺伝子を標的としてランダム変異を導入する。標的代謝反応を亢進する変異が導入された場合、その細菌叢は早く増殖するため、高活性酵素が導入されたことが判別できる(図4)。

#### 4. 研究成果

代謝物相互供与に基づく相利共生型の細菌叢の構築に適切な培地条件を検討した<sup>8</sup>。その後、いくつかのモデル細菌叢を構築し、代謝物相互供与を担う代謝酵素にランダム変異を導入した。結果、野生型の細菌叢を上回る共増殖速度を示す変異型の細菌叢を獲得し、実際に酵素活性の向上が確認された。具体的には、Lysine と Isoleucine を相互供与する相利共生型の細菌叢において、Lysine と Isoleucine の相互供与の強度を外部添加の誘導剤濃度によって人為的に制御したところ、代謝物相互供与の強度に応じて共増殖速度が調節できることが実証された。この細菌叢を用いて実際に代謝物相互供与を担う代謝酵素 (Lysine 合成酵素 *LysA* および Isoleucine 合成酵素 *ilvE*) にランダム変異を導入した結果、野生型の細菌叢を上回る共増殖速度を示す変異型の細菌叢を多数獲得することに成功した。これらの変異体酵素を個別に生成し、実際の代謝活性を評価した結果、前駆体に対する  $K_m$  値の改善が確認された。これらの高活性化 *LysA* を導入した大腸菌の Lysine 生産能は従来の 2.3 倍に向上した。

以上の様に、微生物の相利共生に標的酵素を絡めることで、標的酵素の高活性化が相利共生微生物の増殖能として顕在化する新たな酵素活性評価システムを構築した。この方法では、培養液の吸光度を計測するだけで標的酵素の活性変化を評価できる。今後は、ドロップレット培養系などと組み合わせることでよりハイスループットの酵素スクリーニング法として開発する。

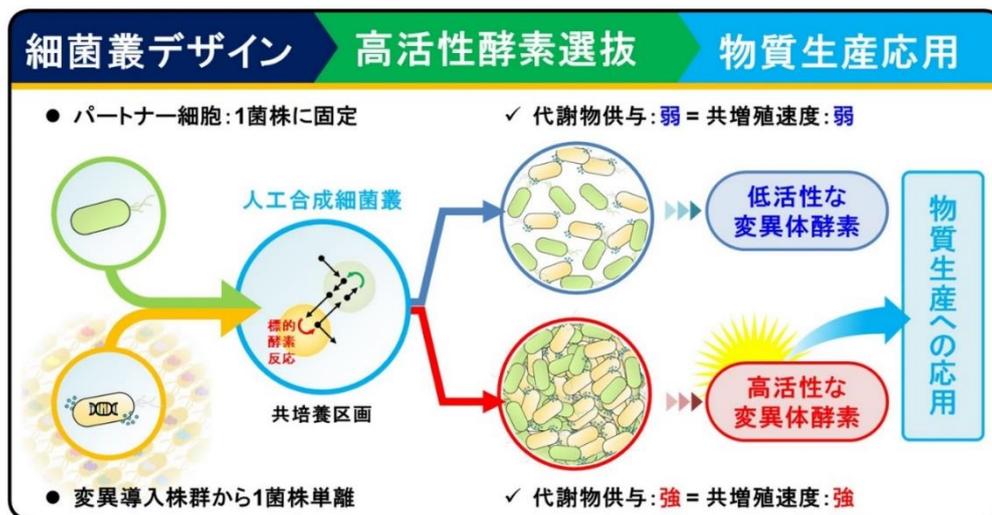


図 4. 研究の基本構想

#### 参考文献

1. Holtz, William J., and Jay D. Keasling. "Engineering static and dynamic control of synthetic pathways." *Cell* 140.1 (2010): 19-23.
2. Zhang, Fuzhong, James M. Carothers, and Jay D. Keasling. "Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids." *Nature biotechnology* 30.4 (2012): 354-359.
3. Hartline, Christopher J., et al. "Dynamic control in metabolic engineering: Theories, tools, and applications." *Metabolic engineering* 63 (2021): 126-140.
4. Gupta, Apoorv, et al. "Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit." *Nature biotechnology* 35.3 (2017): 273-279.
5. Soma, Yuki, et al. "Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch." *Metabolic engineering* 23 (2014): 175-184.
6. Soma, Yuki, Taiki Yamaji, and Taizo Hanai. "Dynamic metabolic engineering of *Escherichia coli* improves fermentation for the production of pyruvate and its derivatives." *J Biosci Bioeng* 133.1 (2022): 56-63.
7. Brenner, Katie, Lingchong You, and Frances H. Arnold. "Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology." *Trends in biotechnology* 26.9 (2008): 483-489.
8. Soma, Yuki, et al. "Trace impurities in sodium phosphate influences the physiological activity of *Escherichia coli* in M9 minimal medium." *Scientific reports* 13.1 (2023): 17396.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|                                                                                                                                                                                                      |                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Soma Yuki, Izumi Yoshihiro, Shimohira Takehiko, Takahashi Masatomo, Imado Yuri, Tominaga Saki, Tokito Kanako, Hata Kosuke, Shinadama Shoji, Oshiro Mana, Hayakawa Yoshihiro, Bamba Takeshi | 4. 巻<br>12              |
| 2. 論文標題<br>In-Needle Pre-Column Derivatization for Amino Acid Quantification (iPDAQ) Using HPLC                                                                                                      | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Metabolites                                                                                                                                                                                | 6. 最初と最後の頁<br>807 ~ 807 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/metabo12090807                                                                                                                                                   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|                                                                                                                                             |                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1. 著者名<br>Soma Yuki, Tominaga Saki, Tokito Kanako, Imado Yuri, Naka Kosuke, Hanai Taizo, Takahashi Masatomo, Izumi Yoshihiro, Bamba Takeshi | 4. 巻<br>13          |
| 2. 論文標題<br>Trace impurities in sodium phosphate influences the physiological activity of Escherichia coli in M9 minimal medium              | 5. 発行年<br>2023年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports                                                                                                                | 6. 最初と最後の頁<br>17396 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-023-44526-4                                                                                      | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|                                                                                                         |                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1. 著者名<br>Ohkubo Tomoki, Soma Yuki, Sakumura Yuichi, Hanai Taizo, Kunida Katsuyuki                      | 4. 巻<br>13          |
| 2. 論文標題<br>A hybrid in silico/in-cell controller for microbial bioprocesses with process-model mismatch | 5. 発行年<br>2023年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports                                                                            | 6. 最初と最後の頁<br>13608 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-023-40469-y                                                  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>相馬悠希                       |
| 2. 発表標題<br>微生物生体に迫る合成生物学的アプローチ        |
| 3. 学会等名<br>2023年度 日本微生物生態学会 第36回 浜松大会 |
| 4. 発表年<br>2023年                       |

|                                                |
|------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>相馬凜、西村朋起、相馬悠希                       |
| 2. 発表標題<br>人工的にデザインした相利共生細菌叢を用いた新たな酵素進化工学手法の開発 |
| 3. 学会等名<br>第45回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム        |
| 4. 発表年<br>2023年                                |

|                                           |
|-------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>相馬悠希                           |
| 2. 発表標題<br>微生物の生体分子・個・集団の機能をデザインする合成生物学研究 |
| 3. 学会等名<br>日本生物工学会 九州支部 創立30周年記念講演会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2023年                           |

|                                            |
|--------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>相馬凜、花井泰三、濱田浩幸、相馬悠希              |
| 2. 発表標題<br>微生物間の代謝物相互作用に着目した新たな酵素進化工学手法の開発 |
| 3. 学会等名<br>第29回日本生物工学会九州支部福岡大会             |
| 4. 発表年<br>2023年                            |

|                                         |
|-----------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>微生物バイオプロダクションのための人工遺伝子回路の再構築 |
| 2. 発表標題<br>中田匠哉、花井泰三、濱田浩幸、相馬悠希          |
| 3. 学会等名<br>第29回日本生物工学会九州支部福岡大会          |
| 4. 発表年<br>2023年                         |

|                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>Rin Soma, Tomoki Nishimura, Natsuki Asada, Takuya Nakada, Yuki Soma |
| 2. 発表標題<br>Design, analysis and application of synthetic microbial consortia   |
| 3. 学会等名<br>Asian Synthetic Biology Association (ASBA) Meeting 2023             |
| 4. 発表年<br>2023年                                                                |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>松澤多聞、相馬悠希、花井泰三、濱田浩幸        |
| 2. 発表標題<br>生成AIを用いた最小タンパク質設計のためのアプローチ |
| 3. 学会等名<br>第29回 日本生物工学会九州支部 福岡大会      |
| 4. 発表年<br>2023年                       |

|                                         |
|-----------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>笠 皓恵、濱田浩幸、相馬悠希、花井泰三          |
| 2. 発表標題<br>高感度NADPHセンサー構築のための高活性SoxRの取得 |
| 3. 学会等名<br>第29回 日本生物工学会九州支部 福岡大会        |
| 4. 発表年<br>2023年                         |

|                                            |
|--------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>朝田捺暉、濱田浩幸、相馬悠希、花井泰三             |
| 2. 発表標題<br>変異導入LuxRによる人工Luxシステムの動作安定性向上の試み |
| 3. 学会等名<br>第29回 日本生物工学会九州支部 福岡大会           |
| 4. 発表年<br>2023年                            |

〔図書〕 計2件

|                                        |                 |
|----------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>相馬悠希, 花井泰三                   | 4. 発行年<br>2023年 |
| 2. 出版社<br>シーエムシー出版                     | 5. 総ページ数<br>264 |
| 3. 書名<br>『未培養微生物研究の最新動向』 監修青柳秀紀 (筑波大学) |                 |

|                                             |                 |
|---------------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>相馬悠希, 花井泰三                        | 4. 発行年<br>2023年 |
| 2. 出版社<br>シーエムシー出版                          | 5. 総ページ数<br>290 |
| 3. 書名<br>『微生物を活用した有用物質の製造技術』 監修 蓮沼誠久 (神戸大学) |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|