

(平成 26 年度 研究実施報告)

国際科学技術共同研究推進事業 (戦略的国際共同研究プログラム)

(研究領域「低炭素社会のためのメタボロミクス」)

研究課題名「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」

平成26年度実施報告書

代表者氏名 福崎英一郎
(大阪大学工学研究科・教授)

1. 原著論文発表

(以下の記載要領にしたがって、平成 25 年度の論文実績について記載してください。)

1-1. 原著論文発表

① 発行済論文数

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	(0 件)
国際誌 5 件	(0 件)
計 5 件	(0 件)

※本共同研究の相手側チーム研究者との共著に限る

(記入例)

* 1. Taro Kagaku and Hanako Senryaku, “Core Research for Evolutional Science and Technology”, Journal of JST, vol. 1, No. 1, pp.1-10, 2011 (DOI:〇〇〇〇)

1. Tsugawa H, Ohta E, Izumi Y, Ogiwara A, Yukihiro D, Bamba T, Fukusaki E, Arita M. MRM-DIFF: data processing strategy for differential analysis in large scale MRM-based lipidomics studies. Front Genet. 2015 Jan 30;5:471. doi: 10.3389/fgene.2014.00471. eCollection 2014.

2. Nakayama Y, Tsugawa H, Bamba T, Fukusaki E. Novel Strategy for Non-Targeted Isotope-Assisted Metabolomics by Means of Metabolic Turnover and Multivariate Analysis. Metabolites. 2014 Aug 25;4(3):722-39. doi: 10.3390/metabo4030722.

3. Shuichi Kajihata, Chikara Furusawa, Fumio Matsuda and Hiroshi Shimizu, “OpenMebius: An open source software for isotopically nonstationary ¹³C-based metabolic flux analysis”, BioMed Research International, Article ID 627014, 2014 (DOI: 10.1155/2014/627014)

4. Fumio Matsuda, Tairo Ogura, Atsumi Tomita, Ichiro Hirano, Hiroshi Shimizu, “Nano-scale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry using the multiple reaction monitoring mode based quantitative platform for analyzing multiple enzymes associated with central metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* using ultra fast mass spectrometry”, Journal of Bioscience Bioengineering, vol. 119, No.1, pp.117-120, 2015 (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.06.010.)

3. Fumio Matsuda, Rethinking mass spectrometry-based small molecule identification strategies in metabolomics, Mass Spectrometry, vol. 3, No. S2, pp. S0038, 2014 (DOI: 10.5702/massspectrometry.S0038)

② 未発行論文数

(受理前のものは含めないでください。受理後、掲載巻・号・ページ等が未定の場合は“accepted”、決定しているものは“in press”と付記してください。)

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	(0 件)
国際誌 2 件	(0 件)
計 2 件	(0 件)

※本共同研究の相手国チーム研究者との共著に限る

1. Syunsuke Nishino, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, “Absolute quantitation of glycolytic intermediates reveals thermodynamic shifts in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking PFK1 or ZWF1 genes”, *Journal of Bioscience Bioengineering*, 2015 (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.01.012.) (accepted)

2. Shuichi Kajihata, Fumio Matsuda, Mika Yoshimi, Kenshi Hayakawa, Chikara Furusawa, Akihisa Kanda, Hiroshi Shimizu, ¹³C-based metabolic flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* with a reduced Crabtree effect, *Journal of Bioscience Bioengineering*, 2015 (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014) (accepted)

A 終了報告書

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)
アメリカ側研究代表者(所属組織)※カタカナ	James C. Liao (UCLA)
前期支援期間	H23年12月-H27年3月
日本チームの研究費(直接経費)	103,040,000円

日本チームの主たる共同研究者(研究担当者/組織名)	
Sastia Prama Putri	大阪大学工学研究科
津川裕司	大阪大学工学研究科
中山泰宗	大阪大学工学研究科
Shao Thing Teoh	大阪大学工学研究科
馬場健史	大阪大学工学研究科
Zanariah Binti Hashim	大阪大学工学研究科
野口真悟	大阪大学工学研究科
大竹利幸	大阪大学工学研究科
平子哲也	大阪大学工学研究科
川瀬直樹	大阪大学工学研究科
清水 浩	大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻
松田 史生	大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻
平沢 敬	東京工業大学 大学院生命理工学研究科 生物プロセス専攻
古澤 力	大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻
大野 聡	大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻
岡橋 伸幸	大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻
梶畠秀一	大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻
本田 謙一郎	奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科 システム情報学領域
小野 直亮	奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 システム情報学領域
西野 駿佑	大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻

松田 史生	大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻 (神戸大学自然科学系先端融合研究環重点研究部)
近藤 昭彦	神戸大学自然科学系先端融合研究環重点研究部
山田 亮介	神戸大学自然科学系先端融合研究環重点研究部
藤富 啓介	神戸大学自然科学系先端融合研究環重点研究部
加藤 寛子	神戸大学自然科学系先端融合研究環重点研究部

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。¹³C 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手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

メタボローム分析法の構築:細胞内代謝状態のスナップショットを得るためのワイドターゲットメタボローム分析法、および動的側面を解析するためのターンオーバー解析法を開発し、高級アルコール生産株の問題点を同定して代謝工学へと応用した。メタボローム分析結果から、1-プロパノール生産株の改良に重要な知見を得ることができた。さらに、スナップショット分析とターンオーバー解析を組み合わせて経路間のシナジーを捉えることができた。

アンサンブルモデリング法の開発では、米国チームが作成した代謝モデルのスクリーニングに、日本チームが観測し、組織化したメタボロームデータを活用した。その結果、妥当な速度論パラメータをもつ常微分方程式ベースの大腸菌代謝モデルを構築できた。また細胞内代謝の安定性を反映したロバスト解析を組み込んだ Ensemble Modelling for Robustness Analysis (EMRA) 法を開発した。

1-ブタノール生産 *Synechococcus* の改良では、1-ブタノール生産 *Synechococcus* のマロニル CoA 合成およびアセトアセチル CoA 合成反応に着目し、NADPH 依存型酵素の導入により1-ブタノール生産能の向上に成功した。さらに酸素感受性のブチルアルデヒド脱水素酵素を非感受性型に変更することにより、1-ブタノール生産能を 20 倍向上させることに成功した。さらなる生産能向上のためにスナップショット分析とターンオーバー解析を行い、ピルビン酸からアセチル CoA への変換がボトルネックになっていると推測した。

以上のように、代謝工学への貢献を指向した独自性の高いメタボローム分析システム開発プロジェクトから、低炭素化社会を実現するための代謝工学を推進する有用なメタボロミクスツールの構築を行った。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。

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 9 名の学生およびポスドク、PI がそれぞれ 1-2 ヶ月程度の相互訪問を実施した。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もたらされたといえる。また 2014 年 6 月 4、5 日に国際メタ

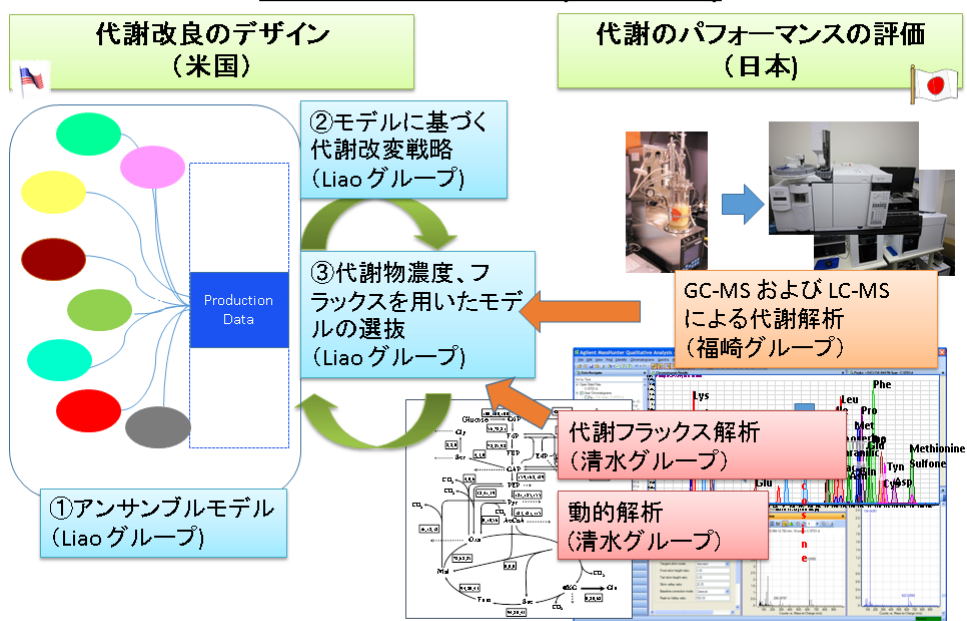
ボロミクスワークショップを開催し、全メンバーのプレゼンテーションに加え、日米から 8 名の専門家の参加得て、メタボロミクスツールを用いた代謝工学について議論を行なった。

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 報の学术论文を発表した。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 AIoutput, 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。



プロジェクトの概要 (日本-米国)



B FINAL REPORT (DIGEST FOR PUBLIC)

Project Title	Development of novel metabolic analysis system for 1-butanol production
Research Leader in Japan (Organization)	Eiichiro Fukusaki (Osaka University)
Research Leader in the U.S. (Organization)	James C. Liao (UCLA)
First Period	Dec. 2011 – Mar. 2015

List of Co-researchers	
Sastia Prama Putri	Osaka University, Dept. of Biotechnology, Grad. School of Engineering
Hiroshi Tsugawa	RIKEN
Yasumune Nakayama	Osaka University, Dept. of Biotechnology, Grad. School of Engineering
Shao Thing Teoh	Osaka University, Dept. of Biotechnology, Grad. School of Engineering
Takeshi Bamba	Osaka University, Dept. of Biotechnology, Grad. School of Engineering
Zanariah Binti Hashim	Osaka University, Dept. of Biotechnology, Grad. School of Engineering
Shingo Noguchi	Osaka University, Dept. of Biotechnology, Grad. School of Engineering
Toshiyuki Ohtake	Osaka University, Dept. of Biotechnology, Grad. School of Engineering
Tetsuya Hirako	Osaka University, Dept. of Biotechnology, Grad. School of Engineering
Naoki Kawase	Osaka University, Dept. of Biotechnology, Grad. School of Engineering
Hiroshi Shimizu	Osaka University, Dept. Of Bioinformatic Engineering, Grad. School of Information Science and Technology
Fumio Matsuda	Osaka University, Dept. Of Bioinformatic Engineering, Grad. School of Information Science and Technology
Takashi Hirasawa	Tokyo Institute of Technology, School and Graduate School of Bioscience and Biotechnology
Chikara Furusawa	Osaka University, Dept. Of Bioinformatic Engineering, Grad. School of Information Science and Technology
Satoshi Ono	Osaka University, Dept. Of Bioinformatic Engineering, Grad. School of Information Science and Technology
Tubasa Nakajima	Osaka University, Dept. Of Bioinformatic Engineering, Grad. School of Information Science and Technology
Shuichi Kajihata	Osaka University, Dept. Of Bioinformatic

	Engineering, Grad. School of Information Science and Technology
Nobuyuki Okahashi	Osaka University, Dept. Of Bioinformatic Engineering, Grad. School of Information Science and Technology
Kenichiro Honda	NAIST, Information Science
Satomi Banno	Osaka University, Dept. Of Bioinformatic Engineering, Grad. School of Information Science and Technology
Naoaki Ono	NAIST, Information Science
Syunsuke Nishino	Osaka University, Dept. Of Bioinformatic Engineering, Grad. School of Information Science and Technology
Fumio Matsuda	Kobe University, Organization of Advanced Science and Technology
Akihiko Kondo	Kobe University, Dept. Of Chemical Science and Engineering
Ryosuke Yamada	Kobe University, Organization of Advanced Science and Technology
Keisuke Fujitomi	Kobe University, Dept. Of Chemical Science and Engineering
Hiroko Kato	Kobe University, Dept. Of Chemical Science and Engineering

Main Title

Metabolomics-driven approach for strain improvement of biofuel-producing microorganisms for a low carbon society

General Objects and Main Issues

Metabolomics-driven approach for strain improvement of 1-butanol producing Escherichia coli and Synechococcus elongatus

Metabolomics is a powerful technology to guide strain design for biofuel production in two aspects: 1) it can focus on the metabolites in the most relevant pathway, such as central metabolism, and 2) it can seek out metabolites in unrelated pathways but are dramatically altered by the production of biofuel. The main objective of this project is to develop a platform technology using metabolomic analysis for improving 1-butanol production in recombinant organisms such as *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Synechococcus elongatus*. Specifically, the aims of this project are 1) to develop a metabolomics analysis methodology, 2) to develop methods to integrate metabolomics with metabolic models, and 3) to improve the production strains using the above methods.

Methods and Technologies

Development and application of comprehensive non-targeted and targeted metabolic profiling platforms and high throughput ensemble modelling (EM) techniques

For analysis of key metabolites including sugar phosphates, nucleic acids, CoA compounds, multivalent organic acids, a novel, comprehensive and user-friendly GC-MS and LC-MS/MS (triple stage) based widely targeted system was developed. In addition, a method for comprehensive and quantitative profiling of CoA compounds by LC-MS/MS was developed for the purpose of elucidating the metabolic pathway in *E. coli*. A new approach to estimate metabolic distance was developed using principal component analysis (PCA) of metabolic turnover data. The newly developed metabolic turnover analysis is useful to visualize metabolic dynamism and cellular processes.

For semi-rational comparison of strains at the metabolome level that can provide hints for phenotype improvement without fully elucidating the underlying mechanisms, a data-driven methodology for semi-rational prediction of significant metabolites by metabolome analysis using acquired metabolomics data was developed and validated. In addition, a high throughput ensemble modeling (EM) strategy for screening kinetic parameters based on end-point metabolite measurements was developed. This approach builds an ensemble of models all anchored to the same end point of fermentation, to which model parameter screening is performed based on metabolite measurements at the end of point of fermentation. Thus, the model ensemble can learn with the metabolomics data and become increasingly predictive as more data are generated.

Results and Social Impacts

A highly sensitive, selective and comprehensive non-targeted and targeted GC/MS based metabolic profiling system was successfully developed for widely targeted metabolomics. In addition to the snapshot analysis, we also developed metabolic turnover analysis to visualize metabolic dynamics of the cell. Its application to elucidation of metabolism of transgenic *E. coli* yielded important targets for strain improvement and revealed metabolic features supporting the synergy between different pathways in *E. coli* 1-propanol production. The metabolomic data generated was used for model screening in the high throughput ensemble modeling (EM), and a set of dynamic metabolic models with realistic parameters for *E. coli* was obtained. Ensemble Modeling for Robustness Analysis (EMRA) was further developed as an extension of EM for screening models based on the robustness of metabolic pathways. Based on metabolomics and ensemble modelling-derived insights, 1-butanol producing *E. coli* strain was improved by introducing NADH and acetyl CoA driving forces to direct the flux toward 1-butanol pathway, and high 1-butanol production (15-30 g/L; 5 g/L per day) was achieved. In addition, 1-butanol

was produced directly from CO₂ using *S. elongatus*, and metabolic turnover analysis suggested the possibility of further improvement of 1-butanol producing *Synechococcus* by replacing NADPH-consuming enzymes with NADH-consuming homologs. Metabolome analysis of 1-butanol producing *S. elongatus* also revealed two bottleneck reactions in the pathway, namely pyruvate to Acetyl CoA and butyryl CoA to butanal.

This project will impact the field by enriching the toolbox of metabolic engineering and expanding the application field of metabolomics. The collaboration is likely to achieve the most efficient 1-butanol production strain, which may interest multiple companies working on microbial production of fuels and chemicals. Lastly, the impact on society is the development of technologies that reduce the carbon footprint of fuel and chemicals production.

Synergies between US and Japanese Teams

To achieve the final goal of improving 1-butanol production in *E. coli* and *S. elongatus*, this project encouraged close collaboration between the US and Japanese teams. The ongoing effort to improve the 1-butanol producing strains was a direct result of a concerted effort of both parties to share their expertise to achieve a greater goal. Initially, the US team constructed the 1-butanol-producing strains of *E. coli* and *S. elongatus* that were subsequently analysed by the Japan team using newly-developed metabolomics and metabolic flux approaches. After which, direct feedback and insights based on the metabolomics and metabolic flux data from Japan team were given to the US team for further strain manipulation and improvement. In addition, metabolomics and metabolic flux data from Japan team were used by the US team for developing ensemble modeling, an *in silico* approach for engineering non-native pathways in *E. coli* and *S. elongatus*. The US team, who is one of the leading research laboratories for metabolic engineering, did all genetic manipulations. On the other hand, the Japan team comprises experts in metabolomics and metabolic flux analysis fields who are equipped with state-of-the-art analytical tools and machines. This partnership allowed both the US and Japan teams to concentrate their efforts on their expertise, thus resulting in a more efficient and productive research. Another essential aspect of the synergy between the US and Japan teams is the exchange of ideas between the two sides. Since both parties have different backgrounds, this resulted in more fruitful discussions and strategies. This project also supported student and postdoc exchange that enabled students and early career researchers to conduct research in a laboratory with a different laboratory environment from their own and train themselves with interdisciplinary skills as well as having a global perspective that is useful for their future career.

To disseminate results and to integrate research with education, we conducted three programs in the first phase of this project namely 1) a Cross-Pacific seminar series, 2) a

student/postdoc visiting program, and 3) an international metabolomics workshop. The Cross-Pacific seminar series were conducted regularly via Skype throughout the year, and in face-to-face meeting once a year. The seminars, given by PIs and senior researchers to students, were mainly focused on the basics of metabolomics, metabolic modelling, and metabolic engineering for biofuels production as well as reporting research progress and results. The student/postdoc visiting program aimed to establish close interaction between the teams across the Pacific. The project supported the exchange of students and postdocs between the US and the Japan teams in which the visitor was allowed to stay on the other side once per year for 1-2 months. The UCLA students or postdocs benefited from learning metabolic techniques in Japan, while the Japanese students (or postdocs) learned the modeling and strain engineering techniques at UCLA. Within the duration of this project, nine exchanges have occurred between the two sides. These students/postdocs exchanges allow the participants to learn both the scientific expertise and cultural/professional practices in the other country. The participants in this project gained significant international exposure as a result of the exchange. Finally, we held an International Metabolomic Workshop in year 3 to disseminate the results to the community in which all project team members gave oral or poster presentations. In addition, eight external experts from US and Japan attended the workshop. The workshop discussed key strategies of metabolic engineering and participants presented various ways that metabolomic techniques can contribute to the metabolic engineering effort. The workshop also highlighted several success stories and challenges in using metabolomics in metabolic engineering.

Achievements

Under this project, we have published 15 scientific papers in various peer-reviewed international journals in the field of analytical chemistry, metabolic engineering, and bioscience. In addition, student and postdoc members of this project have won awards in reputable academic conferences, such as the Annual Meeting of the Metabolomics Society. This project also resulted in the development of data softwares, such as MRMPROBS and MRM-DIFF, for facilitating data analysis process for the widely targeted metabolomics system. In addition, another software called AIOutput was developed for the non-targeted metabolomics system. OpenMebius was developed for ¹³C-based metabolic flux analysis. All softwares developed in this project are available for public use and has been useful for rapid annotation of low molecular weight metabolites.

Selected list of publications:

1. Nakayama Y, Putri SP, Bamba T, Fukusaki E. Metabolic distance estimation based on principle component analysis of metabolic turnover. *J Biosci Bioeng.* 2014 Mar 26. pii: S1389-1723(14)00066-8. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.02.014. [Epub ahead of print]
2. Shuichi Kajihata, Chikara Furusawa, Fumio Matsuda and Hiroshi Shimizu, “OpenMebius: An open source software for isotopically nonstationary ¹³C-based metabolic flux analysis”, *BioMed Research International*, Article ID 627014, 2014 (DOI: 10.1155/2014/627014)
3. Matsuda F, Tsugawa H, Fukusaki E. Method for Assessing the Statistical Significance of Mass Spectral Similarities Using Basic Local Alignment Search Tool Statistics. *Anal Chem.* 2013 Sep 3;85 (17):8291-7. doi: 10.1021/ac401564v. Epub 2013 Aug 14.
4. Tsugawa H, Arita M, Kanazawa M, Ogiwara A, Bamba T, Fukusaki E. MRMPROBS: Data Assessment and Metabolite Identification Tool for Large-scale MRM-based Widely Targeted Metabolomics. *Anal Chem.* 2013 May 21;85(10):5191-9. doi: 10.1021/ac400515s. Epub 2013 May 1.
5. Tsugawa H, Tsujimoto Y, Arita M, Bamba T, Fukusaki E. GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *BMC Bioinformatics.* 2011 May 4;12:131.

Illustrations

Scheme of the project Japan-USA

