

(平成 24 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24年度実施報告書

代表者氏名 福崎英一郎
(大阪大学大学院工学研究科・教授)

1. 研究実施内容

1-1. 研究実施の概要 公開

GC/MS を基盤としたノンターゲットとターゲット代謝物プロファイリングシステムの開発およびその1-ブタノール生産トランスジェニック大腸菌および藍藻の代謝の解明への応用

昨今、代謝工学技術は目覚ましい進歩を遂げ、種々のバイオ燃料生産外来遺伝子を含む微生物の育種に成功してきた。しかしながら、工業において実用可能な高生産性菌株構築のためには、ハイスループット能を要する体系的で非常に効率的な遺伝子改変戦略が必要となる。本研究では、メタボロミクス技術の有用性を示すモデルとして 1-プロパノール生産遺伝子組換え大腸菌を用いた。代謝解析の結果は生産性の異なる菌株においてそれぞれの特徴を正確に表し、さらに代謝物の網羅的解析により長鎖アルコール生産において障壁となる副反応生成物の想定外の蓄積を明らかにした。さらに 1-プロパノール生産性低下に寄与する因子の探索を行い、生産経路における代謝律速箇所を発見した。結果として、1 g/L 以上の 1-プロパノール最終蓄積量の増加が観察された。

非ストレス条件下で培養したサンプルのメタボローム解析によるストレス耐性に関わる代謝物の予測

非ストレス条件下で培養したサンプルのメタボローム解析によるストレス耐性に関わる代謝物の予測を行うにあたって、平成 24 年度では、出芽酵母変異株の 1-ブタノール耐性を対象に概念の実証を行った。最初に、培養、回収、代謝物抽出の各段階を含めて GC/MS による酵母のメタボローム解析の最適化を行った。次に各種の酵母転写因子破壊株のメタボローム解析を行い、同時に 1% (v/v) 1-ブタノールストレス条件下での比増殖速度を測定し、耐性性能の指標とした。次に、メタボローム解析により得られた代謝物情報を予測因子に、潜在変数を介した回帰分析法の一種である Orthogonal Projection to Latent Structures (OPLS) を用いて耐性の予測モデルを構築した。このモデルより、threonine と glycine が重要代謝物として特定された。したがって、threonine および glycine の分解経路における遺伝子の単一遺伝子破壊株 *cha1Δ*、*gcv1Δ*、*gcv2Δ*、*shm1Δ*、*shm2Δ* を耐性株と推定した。これらの株を取得し、耐性測定を行ったところ、耐性指標値が親株と比べ 24%~26% の上昇を示した。更に、これらの株の耐性を代謝物情報と合わせて、前のモデルに投影した結果、モデルと高い適合度を示した。本研究では非ストレス条件下の代謝物情報からストレス耐性を予測する可能性を証明し、さらには予測モデルを用いた耐性株の取得に成功した。今後、他のアルコール類 (1-プロパノール、イソブタノール、3-メチル-1-ブタノールなど) を対象にして、複数のストレス耐性を向上させることを試みる。最後に本戦略を、バイオ燃料生産能を持った組換え大腸菌に適用することを予定している。

CoA 化合物の網羅的、定量的プロファイリングの開発

本研究の主な観測対象である 1-ブタノール生産大腸菌は *Clostridium* 種由来によるアシル CoA 化合物由来の生産経路にて 1-ブタノールの生産が可能である。しかし、生産量増加を目的とした育種を行う際に、ガスクロマトグラフィー質量分析やイオンペア試薬液体クロマトグラフィー質量分析によって分析を行うアミノ酸やアニオン性化合物の他に、生産経路上の CoA 化合物のプロファイリング情報が非常に重要であることが示唆されている。そこで、液体クロマトグラフィーを用いたアシル CoA 化合物の網羅的分析システムの構築を行った。

2. 研究実施体制 公開

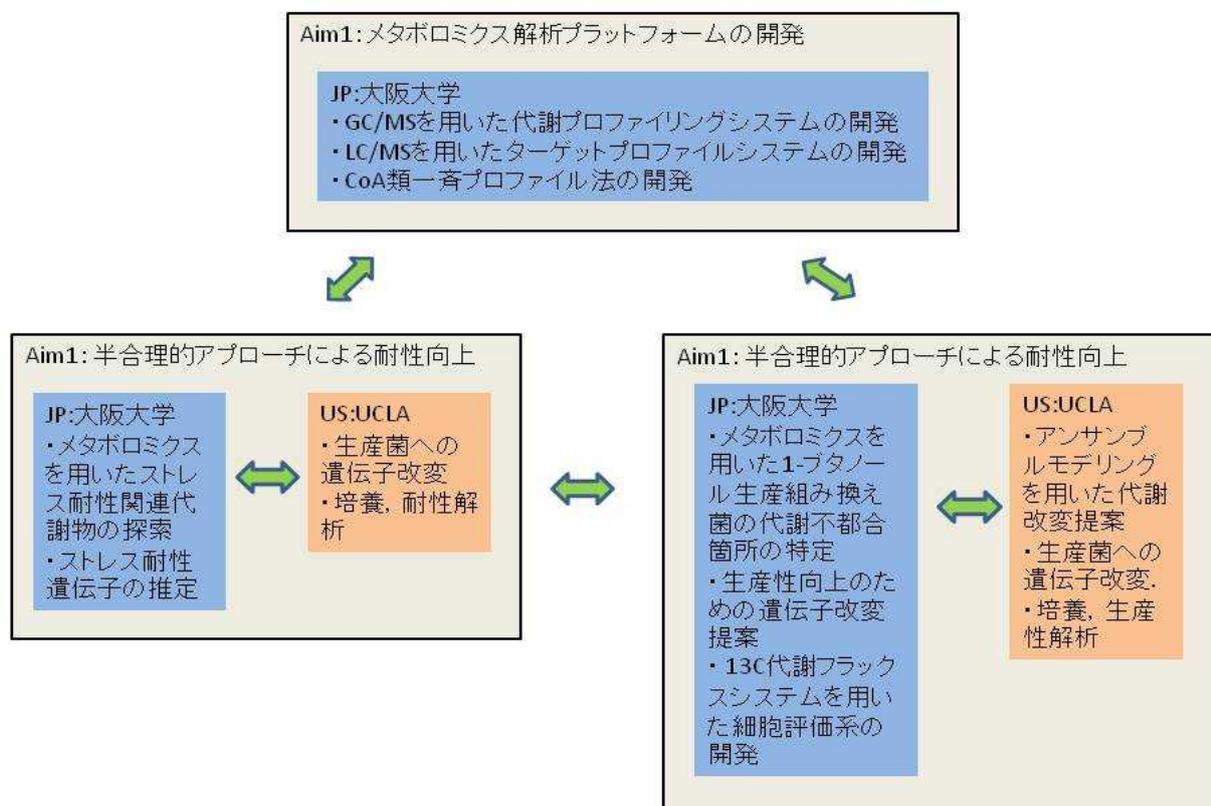
2-1. 日本側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	福崎英一郎	大阪大学	大学院工学研究科	教授
主な共同研究者	清水浩	大阪大学	大学院情報科学研究科	教授
主な共同研究者	松田史生	神戸大学	大学院工学研究科	准教授

2-2. 相手側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	James Liao	UCLA	化学工学科	教授

2-3. 両国の研究実施体制



3. 原著論文発表 公開

3-1. 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 0 件	(0 件)
計 0 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

② 未発行論文数

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