

2014年度 生物工学奨励賞（斎藤賞） 受賞



## 代謝プロファイリングに基づく 微生物育種技術の開発と応用

蓮沼 誠久



### Development of microbe breeding technology based on metabolic profiling

Tomohisa Hasunuma (*Organization of Advances Science and Technology, Kobe University, 1-1 Rokkodai, Nada, Kobe657-8501*) *Seibutsu-kogaku* **93**: 122-129, 2015.

#### はじめに

人類は19世紀まで植物資源から生活に必要なあらゆるものを作り出してきたが、20世紀の急速な石油化学産業の発展により、大量消費・廃棄型の社会構造となり地球規模の気候変動などの問題を生み出した。この問題を解決して持続可能な低炭素・自然共生型の未来社会を実現するためには、再生可能なバイオマスからバイオ燃料や汎用化学品を経済性良く、高効率で生産する技術の開発が必要である<sup>1)</sup>。バイオマスを積極的に利用する技術が確立できれば、CO<sub>2</sub>排出削減による地球上の炭素循環の定常化、持続可能なエネルギーの供給に寄与できる。特に、賦存量が多く、食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマスへの期待は高い<sup>2)</sup>。また近年、水圏のバイオマスを利用する第三代バイオ燃料の生産が注目されている<sup>3)</sup>。藻類の生育に必要なものは、光、水、CO<sub>2</sub>と微量のミネラルだけであり、倍加時間が短いため、一定のバイオマスの収穫に必要な生産域が陸生のバイオマスよりも少なく済む。また、通年の収穫が可能な藻類の利用は、より安定なエネルギー供給を実現し得る。さらに、海洋性藻類を利用すれば、陸生バイオマスの利用で直面する耕作地の限界や水資源の枯渇を回避できる。そこで筆者は、リグノセルロース系バイオマスを高い収率でエタノールに変換する酵母の育種や、シアノバクテリア・微細藻類の生産性を向上させる育種技術の開発に取り組んできた。

産業上有用な株には、基質から目的物質への変換効率の高さと、高い生産性を実現する細胞増殖能力が求められる。一方で、微生物の細胞内代謝は、遺伝子発現、酵素反応、分子間相互作用などを介して厳密に制御され、いわばシステムを構成している。したがって、人為的に代謝系を改変し、有用な微生物を育種するためには、細胞システムの中から最大の効果を生む代謝反応を見いだすことが重要である。本研究では、オミクス解析を利用して代謝状態をグローバルに捉え、*in vivo*同位体標識法による代謝フラックス観測技術（動的代謝プロファイリング技術）を構築して代謝物のターンオーバーを解析することにより、代謝改変の鍵反応を探索した。さらに、遺伝子工学的に鍵反応を制御することで、微生物を高度化する育種に取り組んだ。

#### オミクス解析に基づくリグノセルロース系 エタノール高効率発酵酵母の開発

リグノセルロース系バイオマスの主なものとしては、稲わら、麦わら、もみ殻、バガス、コーンストーバー、スイッチグラス、ネピアグラス、エリアンサスのような草本系バイオマスと、木材チップや廃材などの木質系バイオマスがある。その主成分がセルロースであり、グルコースが $\beta$ 1→4グルコシド結合で直鎖状に重合した $\beta$ -グルカンが水素結合を介して束となる繊維状の結晶構造をとっている<sup>4)</sup>。セルロースを取り囲むようにヘミセルロース、ペクチンといったマトリクス高分子が存在し、

著者紹介 神戸大学自然科学系先端融合研究環（教授） E-mail: hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

その外層にフェニルプロパノイド系芳香族化合物の重合体であるリグニンが沈着して繊維構造をさらに強化している。ヘミセルロースの組成はバイオマスによって異なるが、キシロースが $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4結合したキシラン主鎖にグルコースやアラビノース、グルクロン酸からなる側鎖が連結している<sup>5)</sup>。この強靱な繊維を利用するには、結晶構造を弛緩する前処理と酵素処理が必要になるが、酵素処理に必要な酵素製剤のコストが高い点が問題である(図1)。筆者らは、セルラーゼやヘミセルラーゼを出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞表層に提示することにより、リグノセルロース系バイオマスからのエタノール生産における市販酵素剤の添加量を低減させることに成功してきた<sup>6)</sup>。一連の研究の中で、細胞表層におけるセルラーゼ群の集積が、逐次的なセルロース加水分解反応を速やかに進行させること、加水分解反応の生成物阻害を緩和できること、バイオマスに対するセルラーゼの非特異的吸着を回避できること、酵母を回収して発酵に繰返し利用すれば酵素剤添加量をさらに削減できること、高温耐性酵母を宿主にすれば加水分解反応を促進できること、などを明らかにしてきた<sup>7-13)</sup>。

一方で、リグノセルロース系バイオマスの利用にはもう一つの重大な課題がある(図1)。それは、高温・高圧条件下で行われる前処理工程<sup>14)</sup>で生成するバイオマス過分解物質(酢酸、ギ酸、フラン類、パニリン、シリングアルデヒドなど)による発酵阻害である<sup>6)</sup>。特に、キシロース資化系酵素を導入した出芽酵母のキシロース発酵は強く阻害されることが知られている<sup>15)</sup>。酢酸やギ酸といった低分子の弱酸は、非解離状態で細胞膜を通過し、細胞内で解離してプロトンを放出することで細胞内pH

を低下させる。細胞内pHの低下は中央代謝系や核酸の生合成を阻害する。また、過剰に蓄積したプロトンを出すためにATPaseが稼働して細胞内ATPを枯渇させると考えられている。このように弱酸の細胞内への流入は代謝系全般に悪影響を与えるため、発酵阻害を回避する酵母の育種は容易ではなかった。弱酸の流入を回避するために、発酵液のpHを上昇させる手段もあり得るが、コンタミネーションのリスクが高いリグノセルロース発酵においては得策ではない。そこで本研究では、メタボローム解析によりグローバルな代謝物プロファイルを取得し、酢酸添加により阻害されるエタノール生合成系のボトルネック反応を探索することとした<sup>15)</sup>。実験としては、*Scheffersomyces stipitis* 由来キシロースレダクターゼ(XR) 遺伝子、キシリトールデヒドロゲナーゼ(XDH) 遺伝子、出芽酵母由来キシロキナーゼ(XK) 遺伝子を染色体に導入したキシロース資化性酵母株を用いて、0, 30, 60 mMの酢酸存在下でキシロースを単一炭素源とする好気発酵を行い、解糖系、ペントースリン酸経路(PPP)、TCA回路の中間代謝物や補酵素類の細胞内蓄積量の経時変化を調べた。その結果、添加する酢酸濃度とエタノール生産速度には負の相関がみられ、酢酸濃度依存的にPPPに関与する代謝中間体が蓄積していることが分かった(図2A)。特に、発酵開始24 h後のセドヘプトコース 7-リン酸は、60 mMの酢酸を添加することにより、酢酸非添加時と比べて22倍以上増加した。この結果は、酢酸添加によりPPPの代謝フラックスが減速している可能性を示唆している。そこで、PPPの律速段階と考えられているトランスアルドラーゼの遺伝子 *TAL1* を *TDH3* (トリオースリン酸デヒドロゲナーゼを

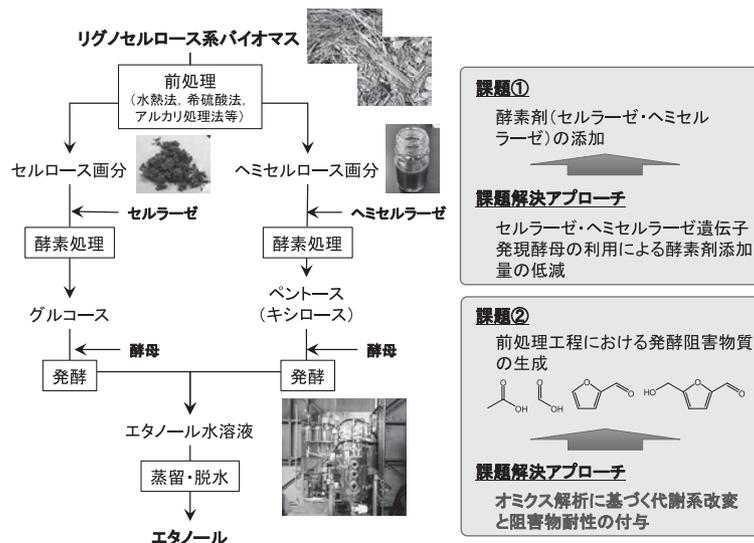


図1. リグノセルロース系バイオマスからのエタノール生産プロセスの開発における課題と課題解決アプローチ

コードする遺伝子) プロモーターの下流に連結して、構成的に過剰発現させた。その結果、*TALI* 高発現型キシロース資化性酵母は酢酸存在下で高いエタノール生産性を示し、30 mM 酢酸存在下では83%の対糖エタノール収率を達成した(図2B)。実際、*TALI* 過剰発現株ではPPPの中間代謝体の蓄積が解消されていることが確認された。また、*TALI*の過剰発現はギ酸存在下のエタノール生産性を向上させることも明らかとした<sup>15)</sup>。ギ酸は酢酸よりも低濃度で発酵を阻害することが分かっている<sup>15)</sup>。そこで、出芽酵母のギ酸耐性能をさらに強化するため、トランスクリプトーム解析によりギ酸応答性の遺伝子を探した。その結果、発酵液に添加するギ酸濃度依存的にギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*FDHI*)の転写物量が増加していることが明らかとなった<sup>16)</sup>。筆者らはギ酸デヒドロゲナーゼによるギ酸分解反応がキシロース発酵中の酵母の生存戦略と推測し、*FDHI*を過剰発現させたところ、20 mMのギ酸存在下でもギ酸非存在下と同程度のエタノールを生産することが分かった<sup>16)</sup>。

次に、*TALI*と*FDHI*を同時に過剰発現するキシロース資化性酵母を作出した<sup>17)</sup>。また、これまでの研究で、二倍体化育種が酵母の高温耐性や低pH耐性を強化する<sup>18)</sup>ことを明らかとしていたため、異なる接合型の*TALI*/*FDHI*共発現株をメイティングして二倍体(*MATa/α*)の*TALI*/*FDHI*共発現型キシロース資化性酵母を作出した。得られた酵母は、30 mM 酢酸、20 mM ギ酸の共存下のキシロース発酵で、コントロール株と比べて12

倍高いエタノール生産速度を示した<sup>17)</sup>。さらに、27 mM 酢酸、20 mM ギ酸を含む稲わら水熱分解液を用いて、実際のバイオマスからの発酵を試みた。発酵後の菌体は遠心分離により回収し、新たな稲わら水熱分解液と混合して発酵を開始することとし、5ラウンドの繰り返し発酵を実施した(図3)。その結果、一倍体のキシロース資化性酵母(コントロール株)では、発酵を繰り返すごとにキシロース消費量とエタノール生産量が低下するのに対し、*TALI*/*FDHI*共発現型二倍体キシロース資化性酵母は、5回の繰り返し発酵を行ってもキシロースを完全に消費し、バイオマスからの発酵能を維持し続けていることが確認できた<sup>17)</sup>。菌体の繰り返し利用は、酵母の細胞増殖に投入するコストおよびエネルギーを節約できるため、バイオエタノール生産の実用化に向けた有効な手段である。発酵阻害物質の存在はリグノセルロース系バイオマスの繰り返し発酵のネックとなっていたが、オミクス解析に基づいて作出したロバストな酵母株は、これを初めて可能にした。

弱酸以外の主要な発酵阻害物質としては、フルフラールやHMF(ヒドロキシメチルフルフラール)などのフラン類が問題である。最近の研究で、酵母はフラン類を還元するアルコールデヒドロゲナーゼを有していることが明らかとなり、*ADH1*や*ADH6*を過剰発現させることにより、フラン存在下のキシロース発酵を向上させることに成功した<sup>19)</sup>。さらに、NADH要求性を有する変異型*ADH1*の遺伝子過剰発現は、過剰発現した*XDH*が産

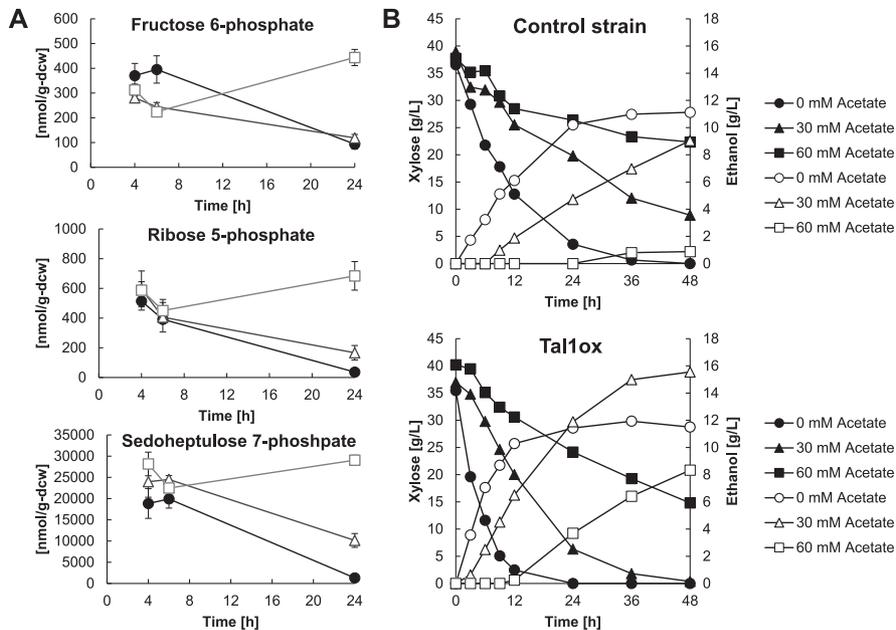


図2. 0 mM (●), 30 mM (△), 60 mM (□) の酢酸存在下でキシロース発酵を行った時の細胞内代謝物プールサイズの経時変化 (A), 0–60 mM 酢酸存在下におけるコントロール株と *TALI* 過剰発現株 (*Tal1ox*) のキシロース (Closed symbols) からのエタノール (Open symbols) 生産 (B)。

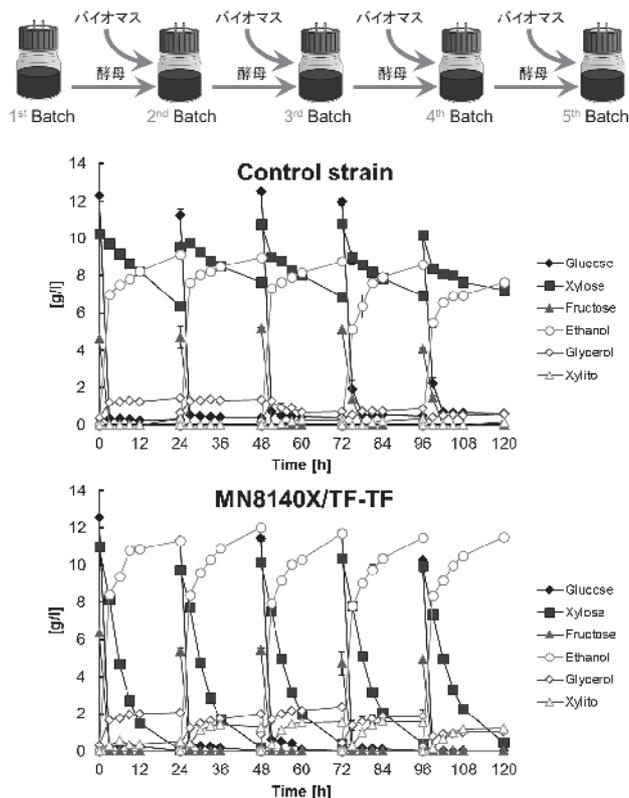


図3. コントロール株および *TALI/FDH1* 共発現型二倍体キシロース資化性酵母 (MN8140X/TF-TF) による稲わら水熱分解液からの5回繰返しバッチ発酵。発酵に用いた酵母は遠心分離で回収した後、新しい稲わら水熱分解液を加えて、次のラウンドのバッチ発酵を開始した。

生ずるNADHによる細胞内レドックスの不均衡を改善し、エタノール収率を向上させることを明らかにした<sup>19)</sup>。

一方、機能未知のアルカリフォスファターゼ (PHO13) の遺伝子過剰発現が弱酸、フラン存在下のキシロース発酵を促進することを最近明らかにした<sup>20)</sup>。また、発酵液への  $Zn^{2+}$  の添加が酢酸存在下のエタノール生産を向上させることが分かり、 $Zn^{2+}$  応答性の遺伝子を単離した<sup>21)</sup>。さらに、高温 (38°C) で高いキシロース発酵能を示す酵母で特異的に発現する遺伝子を単離した<sup>22,23)</sup>。バイオマスからの発酵では酵母は多様なストレスにさらされており、複数の代謝向上因子を組み合わせることはマルチストレス耐性向上の有効な手段である<sup>17,24)</sup>。すでに、出芽酵母の代謝物を幅広くカバーする代謝プロファイリング技術を構築しており<sup>25)</sup>、今後のさらなる解析により、分子育種が進むと考えられる。

### 藻類のメタボローム解析

藻類は光エネルギーをATPやNADPHなどの化学エネルギーに変換し、これらを使ってCO<sub>2</sub>から油脂や多糖類を生産する。油脂はもっとも有望な藻由来バイオ燃料の一つであり、ジェット燃料やバイオディーゼル燃料

としての利用が検討されている。筆者らは、台湾近海から新規の緑藻 *Chlamydomonas* sp. JSC4を単離し、培養液中の窒素源濃度や塩濃度を制御することにより、従来株を上回る油脂生産性を実現してきた<sup>26,27)</sup>。特に、培養液中の塩濃度を徐々に上げていくグラジエントオペレーションが油脂生産の向上に有効であることを明らかにした<sup>26)</sup>。

一方で、藻類に多糖類を生産させる研究も行われている。多くの藻類ではグルコースを $\alpha 1 \rightarrow 4$ ,  $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合により連結し、緑藻ではデンプン、シアノバクテリアではグリコーゲンとして細胞内に蓄積する。これらは、微生物発酵の原料となる<sup>28-32)</sup>だけでなく、オートファーマンテーションによる物質生産の基質となる<sup>33)</sup>ため、多糖類の生産性を向上させることは、藻類からのバイオファイナリーを実現する上で有力なアプローチである。筆者らは、細胞増殖が旺盛でアルカリ環境下での培養が可能なことから、屋外のレースウェイポンドで商業生産されているスピルリナ (*Arthrospira platensis*) に着目した。光強度、CO<sub>2</sub>濃度、栄養塩濃度はスピルリナの細胞内グリコーゲン含有率に影響を及ぼす。特に、培養液中の窒素源 (硝酸塩) 濃度が枯渇すると、グリコーゲンの蓄積が進むことが分かっている (図4)<sup>28-30)</sup>。そこで、強光条件下で、培地中の硝酸塩濃度を通常の1/10まで減らし、全藻体重量の65%までグリコーゲンを蓄積させることに成功した<sup>28)</sup>。窒素源が枯渇した状況で光培養を続けると、細胞はグリコーゲンを蓄積するとともに、タンパク質含量を減少させる<sup>34)</sup>。この時のメタボローム解析を行ったところ、多くの遊離アミノ酸の細胞内含量が一時的に増加した後、減少に転じていることが観測された (図4C)。この結果は、タンパク質から遊離したアミノ酸がグリコーゲン生合成の基質となった可能性を導く。

近年、藻類のメタボローム解析に関する報告が増えつつあるが、メタボローム解析の大きな利点はその一般性である。代謝経路は、多くの場合、種間で互換性を有するため、ゲノム・プロテオーム情報が不明な藻類にもメタボロームは適用できる。藻類をバイオ燃料の原料とすることを考えると、天然から増殖能や物質生産能力の高い株を選抜することはきわめて重要であり、メタボローム解析は有効なツールとなりうる。

### 動的代謝プロファイリングの開発と応用

メタボローム解析により得られる情報は、細胞から代謝物を抽出した時点での蓄積量のスナップショットであり、代謝物の変換速度に関する動的な情報は得られない。たとえば、糖リン酸や糖ヌクレオチド、アミノ酸のように、代謝産物であると同時に代謝反応の基質となる化合

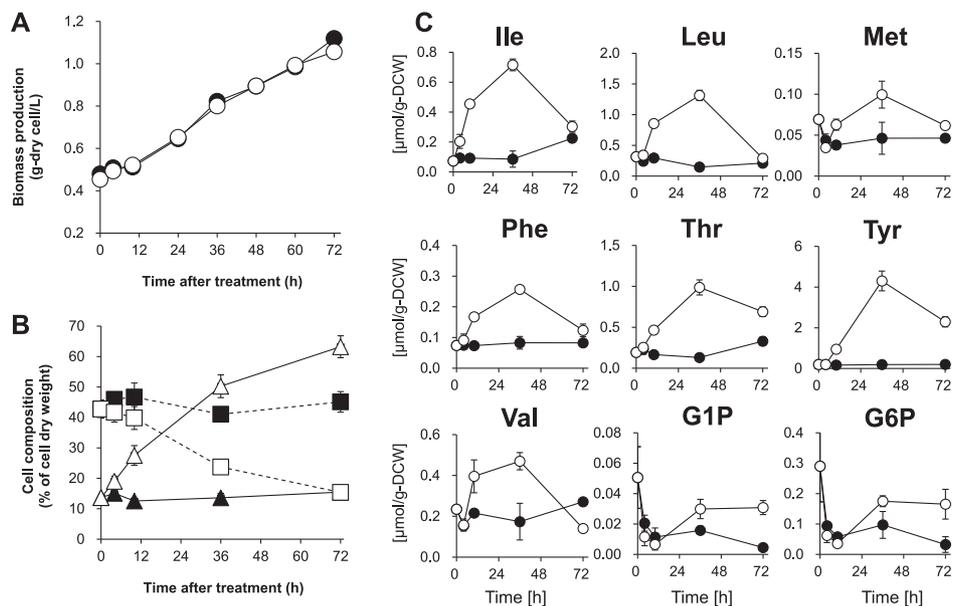


図4. 硝酸塩存在下 (Closed symbols) と非存在下 (Open symbols) で培養した *A. platensis* の細胞密度 (A), タンパク質 (Square) およびグリコーゲン (Triangle) (B), 細胞内代謝物 (C) の経時変化. 硝酸塩非存在下において, グリコーゲン生合成前駆体であるグルコース1リン酸 (G1P) およびグルコース6リン酸 (G6P) が36 hでプラトーに達するのに対し, アミノ酸類は36 hから72 hにかけて減少する.

物の場合, 蓄積量の増減だけではその代謝物に関わる代謝系が活性化したかどうかを判断することは難しい. なぜなら, 代謝系が定常状態にある時, 代謝物の合成と分解はつりあっており, 総量は変わらないからである. つまり, 生合成が活性化してもメタボローム解析でその変化を捉えることはできない. しかしながら, 代謝データに基づいて目的物質を高生産するためには, 代謝物の蓄積量だけではなく, 反応速度論的な情報も重要となる.

そこで筆者らは, 代謝経路の活性化度を知るために, 動的な代謝の流れ, 「代謝ターンオーバー」を直接観測する技術を開発することとした. 中央代謝経路の代謝中間体を網羅的に定量する技術と, 安定同位体炭素 ( $^{13}\text{C}$ ) による *in vivo* 標識技術を組合せた「動的代謝プロファイリング技術」を確立し, 代謝物の蓄積量と動的変動を同時に俯瞰することが可能になった<sup>34,35</sup>.

同位体を利用して代謝経路の特定の原子を標識し, その変化を追跡するトレーサー実験は, 代謝研究に必須の技法の一つである. 元素の化学的性質は電子配置, つまり原子番号で決まり, 原子量にはよらないため, 代謝物中のある原子のたどる道は, その原子を同位体で標識して代謝経路での行動を調べればよい (同位体の質量差による反応速度の差を同位体効果というが, 一般には無視できる). 同位体には, 不安定で放射能を持ち崩壊する放射性同位体と, 安定で崩壊しない安定同位体とがある. 放射性同位体を用いたトレーサー実験はトレーサーが放出する放射線を鋭敏に検出できるため, Calvinらが

$^{14}\text{CO}_2$  を用いて還元的ペントースリン酸経路の構成化合物を決定した<sup>36</sup>のように, 代謝経路や生体内物質の分布などの研究に幅広く使用されてきた. ただし, 放射性核種を使用する放射性トレーサー実験は放射線防護に注意する必要があり, 標識率を定量化できない, 分子内の標識部位を識別できないという欠点も有している.

安定同位体は質量分析 (MS) 計や核磁気共鳴装置で検出することによりトレーサー実験に適用される. 天然存在比が100%に近い $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ といった原子に対し, たとえば $^{13}\text{C}$ は1.1%,  $^{15}\text{N}$ は0.4%しか存在しないため, これらを細胞内に取り込ませることにより, 標識された代謝物を選択的に観測することが可能である (図5). MSはイオン化した代謝物を質量電荷比 ( $m/z$ ) に従って分離して検出するため, 安定同位体標識された化合物は $m/z$ が分子内に含まれる安定同位体の数だけ増加した値を示す (図5). したがって, 安定同位体が含まれない主分子イオン ( $M_m$ ) と安定同位体を含む同位体イオンの強度比を観測することにより安定同位体標識率を算出することができる. また観測したい化合物が開裂して生じるフラグメントイオンは, 試料分子の部分構造を反映するため, その構造が帰属できれば分子内の標識部位を識別することが可能である<sup>37</sup>. MSは通常, ガスクロマトグラフィや液体クロマトグラフィ, キャピラリー電気泳動 (CE) などの分離装置と連結して用いるため, 分離モードを変えることにより幅広い化合物の分析に適用することが可能である.

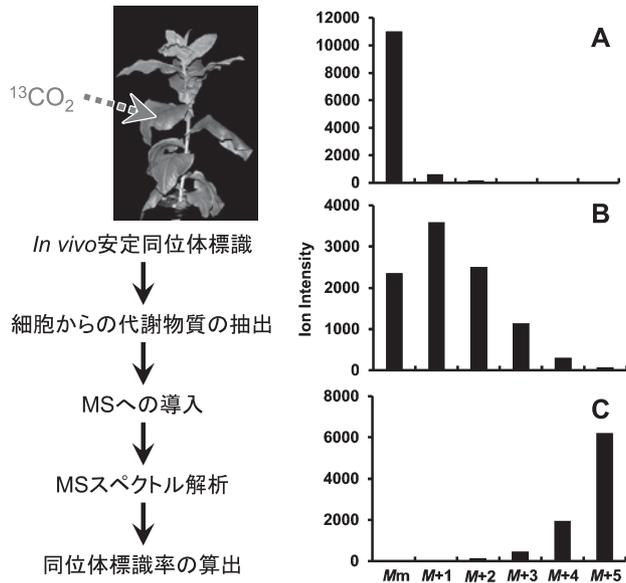


図5. 動的代謝プロファイリングの実験手順(左)と $^{13}\text{CO}_2$ 標識時間の経過に伴う細胞内リブロースビスリン酸(炭素数5)のマススペクトルの変化(右)。右図は標識前(A)および $^{13}\text{CO}_2$ による標識開始後1 min (B), 10 min (C)のマススペクトルを表す。Mmは主分子イオン, M+nは同位体イオンを表す。

筆者らは、 $^{13}\text{CO}_2$ を炭素源として植物体に与えて細胞内炭素代謝物を*in vivo*標識し、同位体標識の濃度分率を経時観測することで、糖リン酸などの微量一次代謝物のターンオーバーに関する情報を得た。 $^{13}\text{CO}_2$ を利用した植物体の標識実験は30年以上前から行われているが<sup>38)</sup>、多くの場合、分析対象となる化合物は糖類や二次代謝物質といった細胞内蓄積量の多い物質に限られていた。しかしながら、近年の分析装置の検出機能の高感度化、マススペクトル情報の高解像度化、データ取得速度の高速化などにより、代謝ネットワーク上の分岐点に位置する微量な中間代謝物の分析が可能になった<sup>34)</sup>。一方で、Calvin回路をはじめとする主要経路のターンオーバーは非常に速く、ターンオーバーを正確に観測するためには、標識化細胞の採集から代謝反応のクエンチングに要する時間をできるだけ短くすることが重要となる。また、短時間で標識を行う場合には $\text{CO}_2$ 固定速度を厳密に管理する必要がある、光合成速度に影響を与えるファクター(光強度、 $\text{CO}_2$ 濃度など)の制御も必須である。そこで、光合成速度をリアルタイムで観測しながら通気する炭酸ガスを $^{12}\text{CO}_2$ から $^{13}\text{CO}_2$ へと切り替えるとともに葉片を瞬時に凍結できるチャンバー(図6)を開発した<sup>34,38)</sup>。光強度 $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、 $\text{CO}_2$ 濃度 $1000 \text{ ppm}$ で光合成させた時、3-ホスホグリセリン酸をはじめとするCalvin回路系化合物は標識開始10分で $^{13}\text{C}$ 標識率が最大となった。この時、糖質生合成系の中

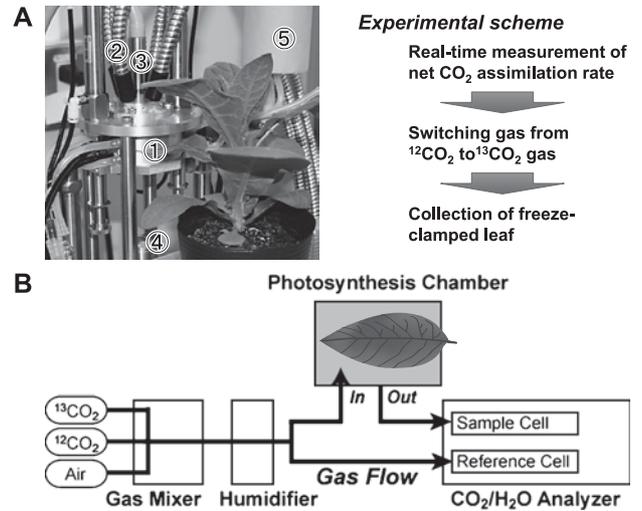


図6. 動的代謝プロファイリングに用いるタバコ生葉の $^{13}\text{CO}_2$ 標識用チャンバー(A)とチャンバーへ供給するガス流路(B)。 $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ アナライザーにより光合成速度をリアルタイムで測定し、光合成速度が定常状態の時にAirと混合する炭酸ガスを $^{12}\text{CO}_2$ から $^{13}\text{CO}_2$ へと切り替える。 $^{13}\text{CO}_2$ 標識用チャンバー①には、光源②、PAMプローブ③、リーフカッター④、液体窒素リザーバー⑤が連結しており、リーフディスクの作製と瞬間凍結が可能になっている。

間代謝物であるグルコース 1-リン酸の標識速度が、前駆体であるグルコース 6-リン酸の標識速度よりも遅い(図7)ことが分かり、グルコース 6-リン酸をグルコース 1-リン酸に変換する酵素反応がスクロース合成の律速段階であることが示唆された<sup>34)</sup>。

次に、シアノバクテリアの動的代謝プロファイリングに取り組んだ。 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を用いて硝酸塩欠乏時の細胞の*in vivo*  $^{13}\text{C}$ 標識を行い、CE-MSを用いて同位体濃度分率を経時観測したところ、グリコーゲンの生合成に利用されている炭素の大部分は、 $^{13}\text{CO}_2$ に由来する炭素ではないことが分かった<sup>33)</sup>。このことは細胞内に遊離してきたアミノ酸が変換を受けて、アミノ酸由来の炭素が糖新生経路に入り、グリコーゲン生合成に利用された可能性を示唆している。

*in vivo*  $^{13}\text{C}$ 標識技術はシアノバクテリアの炭素同化速度を直接評価できる唯一の手法であり、 $\text{CO}_2$ 固定速度の向上を捉えることも可能である(論文投稿中)。さらに、炭素源の細胞内への流入速度と代謝中間体のターンオーバー速度には正の相関が見られることが明らかとなり、その相関係数を調べることで代謝経路のボトルネック反応を推定できることが分かってきた(論文投稿中)。

## おわりに

近年、ゲノム解読技術ならびに合成技術が飛躍的に進歩するとともに、ゲノム編集が可能となり、不要な遺伝

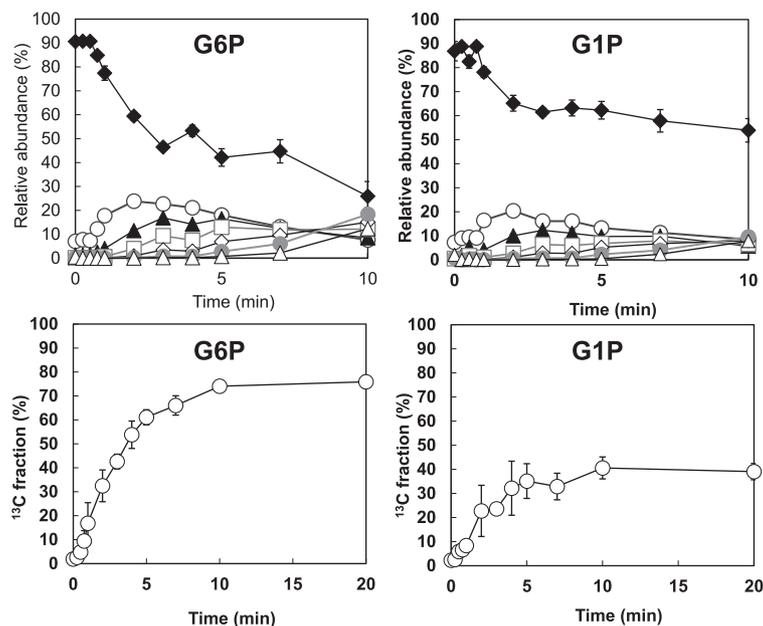


図7.  $^{13}\text{C}$ 標識後のG6PおよびG1Pの質量分布 (上図,  $m_0$ ; ◆,  $m_1$ ; ○,  $m_2$ ; ▲,  $m_3$ ; □,  $m_4$ ; ◇,  $m_5$ ; ●,  $m_6$ ; △) と質量分布から算出した $^{13}\text{C}$ 濃縮度分率の経時変化 (下図)。

子の除去や外来遺伝子の導入・機能改変などが比較的容易に行えるようになってきた。一方、代謝系の改変では、行き当たりばったりの遺伝子操作で細胞に目的の形質を付与できるとは限らず、対象経路の律速反応を的確に制御することが求められる。物質代謝系は、遺伝子の転写や翻訳、酵素活性などにより厳密に調節されるとともに、分子間相互作用によるネットワークを構成している。本研究を通して、グローバルな代謝情報の取得が代謝改変の鍵反応の絞込みを可能にすることを明らかにした。最近では、あらたな代謝機能を持つ微生物の「合成」が期待され、時には大規模な代謝ネットワークの改変が必要になっている。代謝プロファイリングは代謝改変の戦略を導出し、合理的に微生物の代謝能力を向上させる道筋をつけることができる。今後、バイオリファイナリーに資する微生物の合成において重要な役割を担うであろう。

## 謝 辞

本研究は、地球環境産業技術研究機構(RITE)植物研究グループ、神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻ならびに同自然科学系先端融合研究環にて遂行されました。多大な御指導、御鞭撻を賜りました近藤昭彦先生(神戸大学大学院工学研究科教授)、福崎英一郎先生(大阪大学大学院工学研究科教授)に心から御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、御助言、御協力を頂きました小林昭雄先生(大阪大学名誉教授)、新名惇彦先生(奈良先端科学技術大学院大学名誉教授)、松永是先生(東京農工大学学長)、富澤健一先生(旧RITE植物グループ グループリーダー)、三宅親弘先生(神戸大学大学院農学研究科准教授)、馬場健史先生(大阪大学大学院工学研究科准教授)、荻野千秋先生(神戸大学大学院工学研究科准

教授)、石井純先生(神戸大学自然科学系先端融合研究環准教授)、原田和生先生(大阪大学大学院薬学研究科講師)に深く御礼申し上げます。また、ともに研究を行ったRITEおよび神戸大学における所属研究グループのスタッフ・学生の皆様、科学技術振興機構(JST)さきがけ「藻類バイオエネルギー領域」の関係者の皆様に心から感謝申し上げます。本研究の一部は科学研究費補助金、JSTさきがけ、新エネルギー産業技術総合開発機構などからの支援を受けて実施されました。

## 文 献

- 1) Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K. Y., Ishii, J., and Kondo, A.: *Bioresour. Technol.*, **135**, 513–522 (2013).
- 2) Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., and Foust, T. D.: *Science*, **315**, 804 (2007).
- 3) Dismukes, G. C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G. M., and Posewitz, M. C.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, 235–240 (2008).
- 4) Galbe, M. and Zacchi, G.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **107**, 41–65 (2007).
- 5) Saha, B. C.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 279–291 (2003).
- 6) Hasunuma, T. and Kondo, A.: *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1207–1218 (2012).
- 7) Matano, Y., Hasunuma, T., and Kondo, A.: *Bioresour. Technol.*, **108**, 128–133 (2012).
- 8) Matano, Y., Hasunuma, T., and Kondo, A.: *Bioresour. Technol.*, **135**, 403–409 (2013).
- 9) Matano, Y., Hasunuma, T., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 2231–2237 (2013).
- 10) Sakamoto, T., Hasunuma, T., Hori, Y., Yamada, R., and Kondo, A.: *J. Biotechnol.*, **158**, 203–210 (2012).

- 11) Inokuma, K., Hasunuma, T., and Kondo, A.: *Biotechnol. Biofuels*, **7**, 8 (2014).
- 12) Yanase, S., Hasunuma, T., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 381–388 (2010).
- 13) Hasunuma, T. and Kondo, A.: *Process Biochem.*, **47**, 1287–1294 (2012).
- 14) Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holzapple, M., Ladisch, M. R., and Lee, Y. Y.: *Bioresour. Technol.*, **96**, 1959–1966 (2005).
- 15) Hasunuma, T., Sung, K. M., Sanda, T., Yoshimura, K., Matsuda, F., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **90**, 997–1004 (2011).
- 16) Hasunuma, T., Sanda, T., Yamada, R., Yoshimura, K., Ishii, J., and Kondo, A.: *Microb. Cell Fact.*, **10**, 2 (2011).
- 17) Sanda, T., Hasunuma, T., Matsuda, F., and Kondo, A.: *Bioresour. Technol.*, **102**, 7917–7924 (2011).
- 18) Kato, H., Suyama, H., Yamada, R., Hasunuma, T., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **94**, 1585–1592 (2012).
- 19) Ishii, J., Yoshimura, K., Hasunuma, T., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 2597–2607 (2013).
- 20) Fujitomi, K., Sanda, T., Hasunuma, T., and Kondo, A.: *Bioresour. Technol.*, **111**, 161–166 (2012).
- 21) Ismail, K. S., Sakamoto, T., Hasunuma, T., Zhao, X. Q., and Kondo, A.: *Biotechnol. J.*, in press
- 22) Ismail, K. S., Sakamoto, T., Hasunuma, T., and Kondo, A.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 1039–1050 (2013).
- 23) Ismail, K. S., Sakamoto, T., Hatanaka, H., Hasunuma, T., and Kondo, A.: *J. Biotechnol.*, **163**, 50–60 (2013).
- 24) Hasunuma, T., Ismail, K. S., Nambu, Y., and Kondo, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 165–169 (2014).
- 25) Kato, H., Izumi, Y., Hasunuma, T., Matsuda, F., and Kondo, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 665–673 (2012).
- 26) Ho, S. H., Nakanishi, A., Ye, X., Chang, J. S., Hara, K., Hasunuma, T., and Kondo, A.: *Biotechnol. Biofuels*, **7**, 97 (2014).
- 27) Nakanishi, A., Aikawa, S., Ho, S. H., Chen, C. Y., Chang, J. S., Hasunuma, T., and Kondo, A.: *Bioresour. Technol.*, **152**, 247–252 (2014).
- 28) Aikawa, S., Izumi, Y., Mastuda, F., Hasunuma, T., Chang, J. S., and Kondo, A.: *Bioresour. Technol.*, **108**, 211–215 (2012).
- 29) Aikawa, S., Nishida, A., Ho, S. H., Chang, J. S., Hasunuma, T., and Kondo, A.: *Biotechnol. Biofuels*, **7**, 88 (2014).
- 30) Aikawa, S., Joseph, A., Yamada, R., Izumi, Y., Yamagishi, T., Matsuda, F., Kawai, H., Chang, J. S., Hasunuma, T., and Kondo, A.: *Energy Environ. Sci.*, **6**, 1844–1849 (2013).
- 31) Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., and Chang, J. S.: *Bioresour. Technol.*, **135**, 191–198 (2013).
- 32) Ho, S. H., Kondo, A., Hasunuma, T., and Chang, J. S.: *Bioresour. Technol.*, **143**, 163–171 (2013).
- 33) Kumaraswamy, G. K., Guerra, T., Qian, X., Zhang, S., Bryant, D. A., and Dismukes, G. C.: *Energy Environ. Sci.*, **6**, 3722–3731 (2013).
- 34) Hasunuma, T., Kikuyama, F., Matsuda, M., Aikawa, S., Izumi, Y., and Kondo, A.: *J. Exp. Bot.*, **64**, 2943–2954 (2013).
- 35) Hasunuma, T., Harada, K., Miyazawa, S., Kondo, A., Fukusaki, E., and Miyake, C.: *J. Exp. Bot.*, **61**, 1041–1051 (2010).
- 36) Calvin, M.: *J. Chem. Soc. (London)*, 1895–1915 (1956).
- 37) Huege, J., Sulpice, R., Gibon, Y., Lisee, J., Koehl, K., and Kopka, J.: *Phytochemistry*, **68**, 2258–2272 (2007).
- 38) Schaefer, J., Stejskal, E. O., and Beard, C. F.: *Plant. Physiol.*, **55**, 1048–1053 (1975).
- 39) 蓮沼誠久, 原田和生, 三宅親弘, 福崎英一郎:低温科学, **67**, 169–174 (2009).