

R3.10.14
BioJapan2021



神戸大学

データベース空間からの新規酵素リソースの創出

蓮沼 誠久、秀瀬 涼太

(神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科)

(神戸大学 先端バイオ工学研究センター)

バイオ技術の革新による“微生物モノづくり”の進展

バイオ技術の革新

- 核酸シーケンシング技術
- ゲノム編集技術
- 長鎖DNA集積技術
- IT/AI技術
- メタボロミクス技術 etc..

合成バイオ製品の事業化 (例)

汎用化学品の高効率生産

(省エネ・高い生産性・低コスト化)

コハク酸

1,3-プロパンジオール

イソプレン

ファルネセン

ナイロン中間体

1,4-ブタンジオール



生産困難な高機能物質の大量生産

(新産業の創出)

アルテミシニン

ステビア

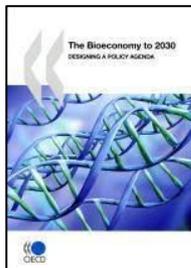
オピオイド系化合物

カロテノイド

ワクチン、抗体 など

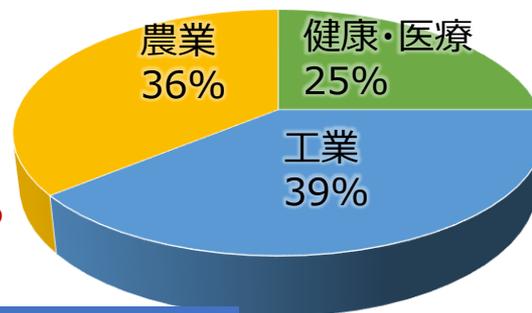


バイオエコノミーの拡大



バイオエコノミー; バイオテクノロジーと経済活動を一体化
バイオエコノミー市場は、2030年OECD加盟国のGDPの2.7%(約200兆円)と予想
(バイオ燃料等は試算から除外)

世界バイオ市場予測 (2030) 約1.6兆ドル



出典: The Bioeconomy to 2030: designing a policy agenda, OECD

工業 (モノづくり) の占める割合が最も大きい

微生物育種システムのファウンドリ化

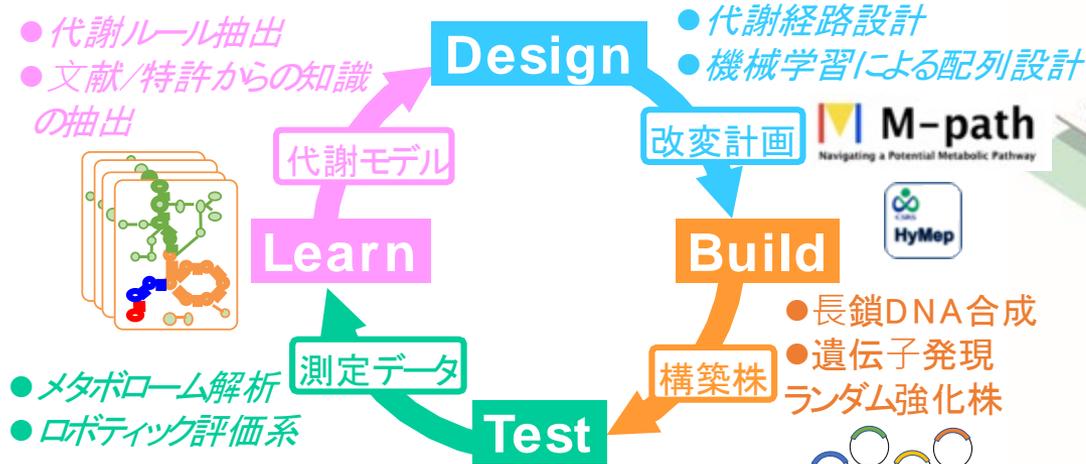
微生物の構築、培養、評価、解析を自動で行うインフラの開発と集積による育種スピードの高速化が世界的な潮流となっている。



スマートセル創出プラットフォームの構築と実証

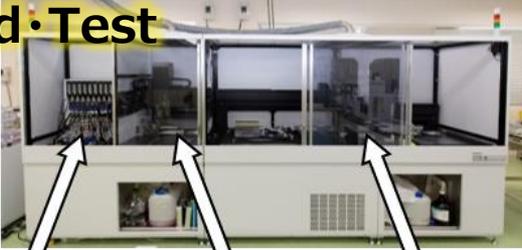
NEDO スマートセルPJ (H28~R2年度)

短期間で生産株を獲得できるスマートセル開発プラットフォーム



独自の要素技術をシステムティックに連結したDBTL型バイオフィactories総合拠点

Build・Test



長鎖DNA合成・自動形質転換プラットフォーム

Learn・Design



データ
実験データ統合管理システム (KIDS)



フィードバック



12連自動培養槽
pH/溶存酸素濃度/温度を自動制御



代謝物抽出ロボット
培養液採取/代謝反応停止ロボット

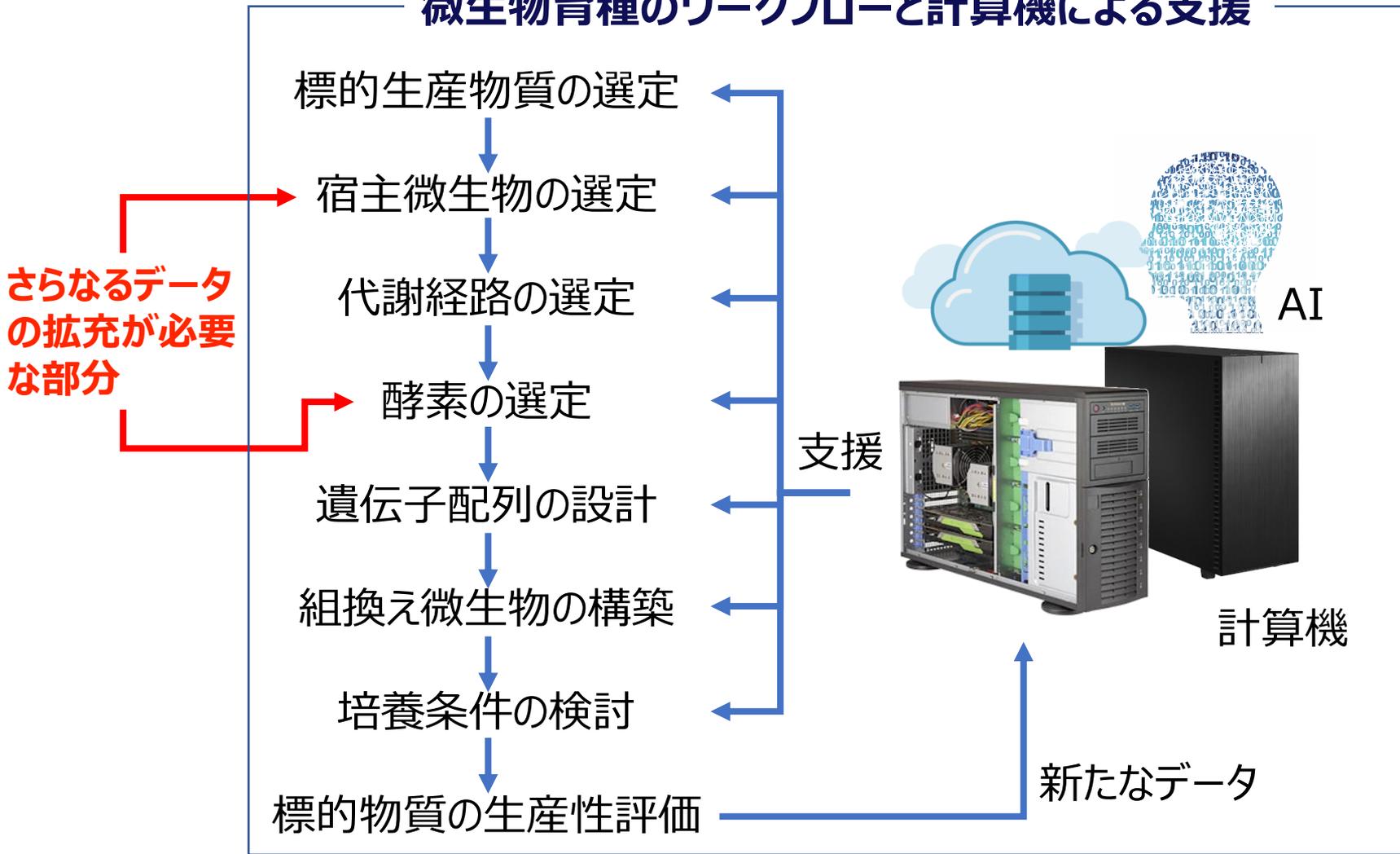


ハイスループットな網羅的代謝解析システム

メタボローム解析自動前処理ロボット

スマートセル創出における未利用バイオ資源の位置づけ

微生物育種のワークフローと計算機による支援



バイオ生産の新しい可能性を広げるため、バイオ資源活用促進基盤技術開発が必要



NEDOカーボンリサイクルPJ（R2～R8年度）

**カーボンリサイクル実現を加速する
バイオ由来製品生産技術の開発**

「データベース空間からの新規酵素リソースの創出」

委託先：神戸大学、東京大学、九州大学、（国研）理化学研究所、
出光興産(株)、小川香料(株)、花王(株)、高砂香料工業(株)、
長瀬産業(株)、不二製油グループ本社(株)

再委託先：千葉大学

6社、1研究機関、4大学

研究開発代表者 神戸大学 副学長 近藤昭彦

研究開発の背景

バイオ・モノづくりでは、天然の反応経路と酵素を制する者が世界を制する

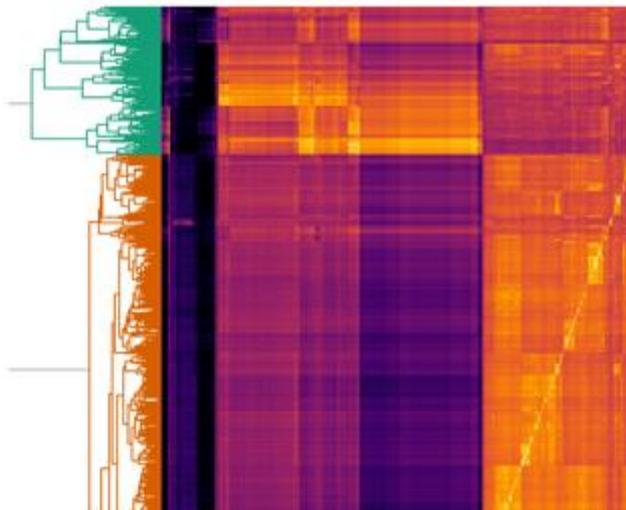
“コードベース”という概念

@米国



RATIONAL + UNBIASED DESIGN

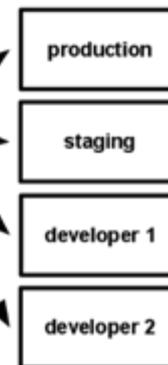
Engineers at Ginkgo utilized a combination of rational design and machine learning approaches to identify better enzymes. The Ginkgo team used our codebase and domain knowledge to pool together a library of 942 unique enzymes, sampled across enzyme families, ecological niches, and structural homologies.



Codebase



Deploys



メタゲノム解析等を通して、ゲノムデータ、酵素データ、代謝経路データを網羅的に取得し、その依存関係を機械学習で計算科学的に明らかにすることにより、**生物が有する**酵素反応と反応経路を全て抑えようとしている



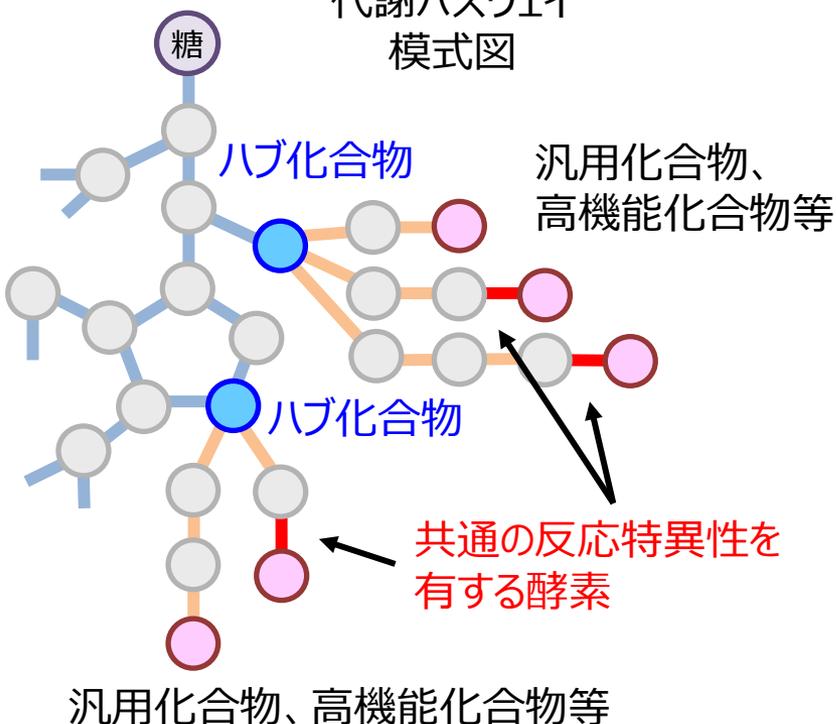
⇒ パスウェイと酵素を獲得するための独自アプローチが必要
新規（人工）酵素に着目したパスウェイ・アトラスの開発

バイオ生産ターゲットに対する『**共通前駆体（ハブ化合物）**』と『**共通の反応特異性を有する酵素（テンプレート酵素）**』を掌握することで、**人工系を含むあらゆる化合物の高生産を短期間で可能にする**という概念

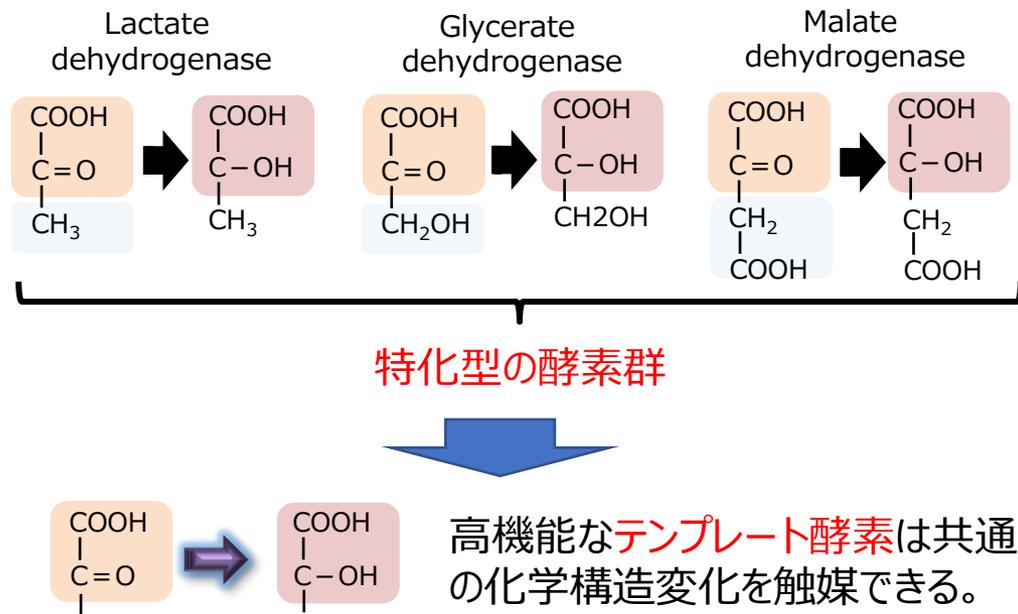
テンプレート酵素の産業有用性

有用な化合物（汎用化合物、高機能化合物、二次代謝物、非天然化合物）の生合成には「共通の反応特異性を有する酵素」が使われていることを見出してきた

代謝パスウェイ
模式図



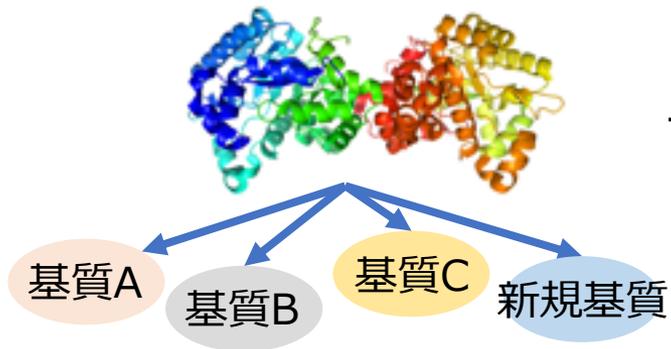
反応特異性に基づく酵素の再分類



『共通の反応特異性を有する酵素（テンプレート酵素）』を掌握することで、共通前駆体（ハブ化合物）から、人工系を含むあらゆる化合物を短期間で高生産できる

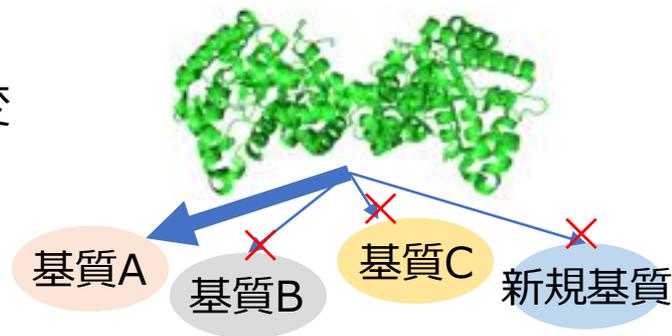
テンプレート酵素の人工酵素への変換

高活性な
テンプレート酵素X



広い基質特異性
高い触媒効率

『超高活性型酵素』や『新規活性酵素』
を含む人工酵素



ケース1：基質Aに特化型酵素

ニーズに基づく改変



テンプレート酵素を起点とした酵素工学を行うことで、
目的の人工酵素を迅速に取得できる

産業界が期待する競争力

産業ニーズのある化合物の高生産に資する『テンプレート酵素ライブラリー』を構築し、
データベース化する

従来の酵素開発の流れ

産業ニーズ：目的の反応（基質）

- 酵素選定に膨大な時間がかかる
- 時間をかけても酵素の取得に至らない場合がある

酵素反応に関する先行研究
（文献など）の調査

- ・ 反応未知
- ・ 反応に関わる酵素の配列が未知
- ・ 特許権侵害回避

- 天然より新規酵素の探索
- 新規特異性の創出（酵素改変）

反応特異性

配列・触媒効率データの比較解析

- 文献の活性値の比較
- 高次構造情報の調査

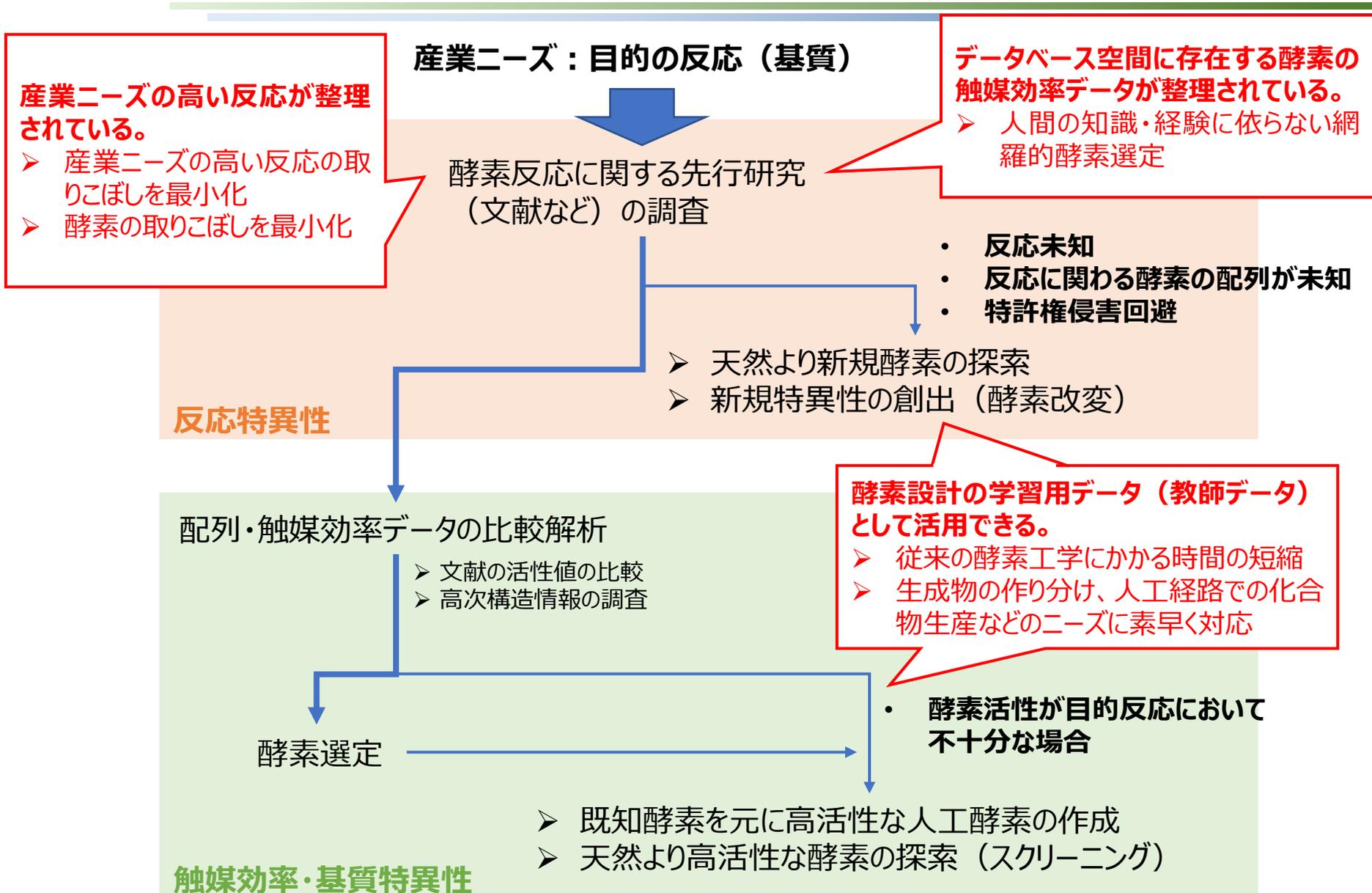
酵素選定

- ・ 酵素活性が目的反応において不十分な場合

- 既知酵素を元に高活性な人工酵素の作成
- 天然より高活性な酵素の探索（スクリーニング）

触媒効率・基質特異性

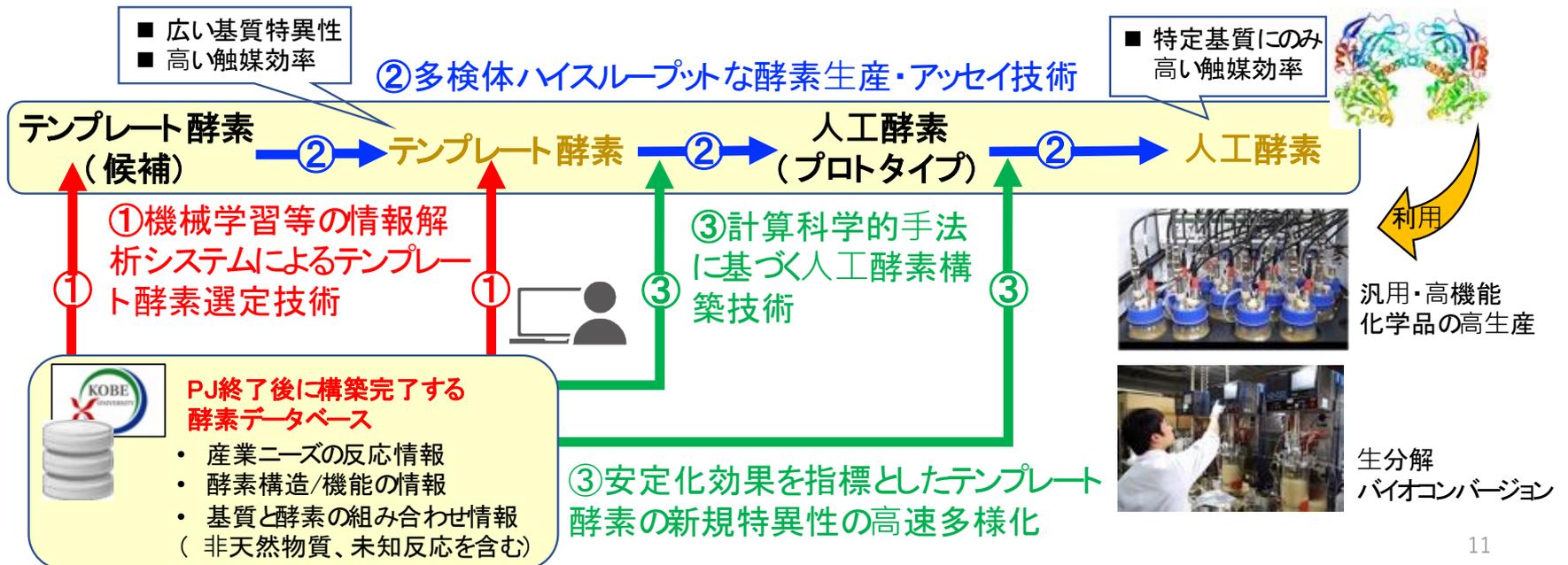
従来の酵素開発に対する『酵素データベース』の優位性



研究開発項目

- **情報解析とハイスループット実験系を利用したテンプレート酵素の選定と体系化**
(神戸大学、千葉大学、九州大学、東京大学、理化学研究所)
 - 情報解析に基づくテンプレート酵素選定技術の開発
 - ハイスループットアッセイ系の開発
- **安定化効果を指標としたテンプレート酵素の新規特異性の高速多様化**
(千葉大学、神戸大学)
- **ハイスループット実験系を利用した人工酵素ライブラリーの構築技術の開発**
(神戸大学、理化学研究所)
- **データベース空間からの事業化用新規酵素の獲得**

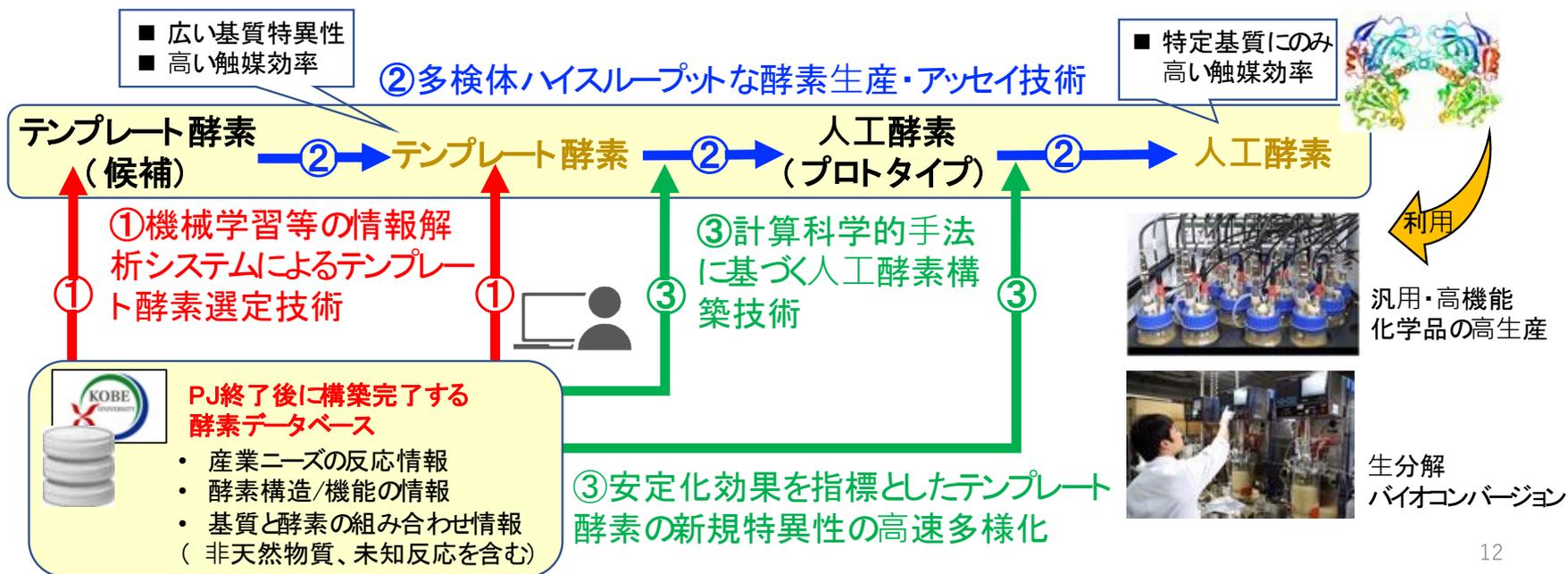
本PJ終了後に構築する酵素開発プラットフォーム



研究開発項目

- **情報解析とハイスループット実験系を利用したテンプレート酵素の選定と体系化**
(神戸大学、千葉大学、九州大学、東京大学、理化学研究所)
 - 情報解析に基づくテンプレート酵素選定技術の開発
 - ハイスループットアッセイ系の開発
- **安定化効果を指標としたテンプレート酵素の新規特異性の高速多様化**
(千葉大学、神戸大学)
- **ハイスループット実験系を利用した人工酵素ライブラリーの構築技術の開発**
(神戸大学、理化学研究所)
- **データベース空間からの事業化用新規酵素の獲得**

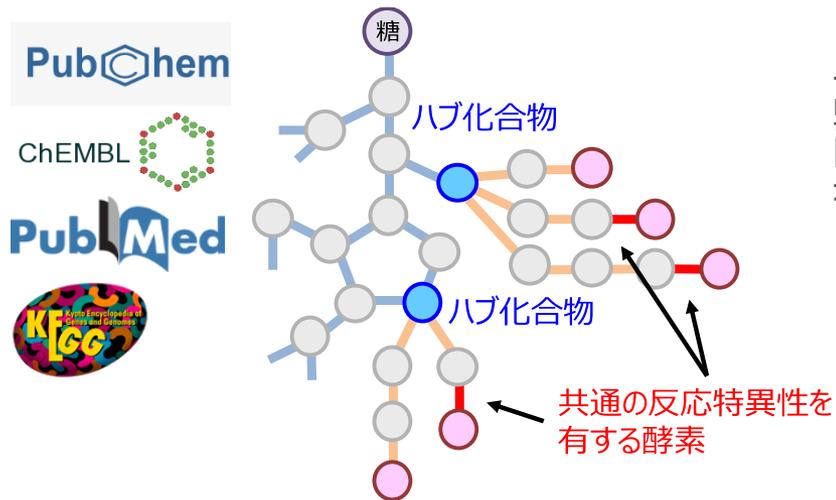
本PJ終了後に構築する酵素開発プラットフォーム



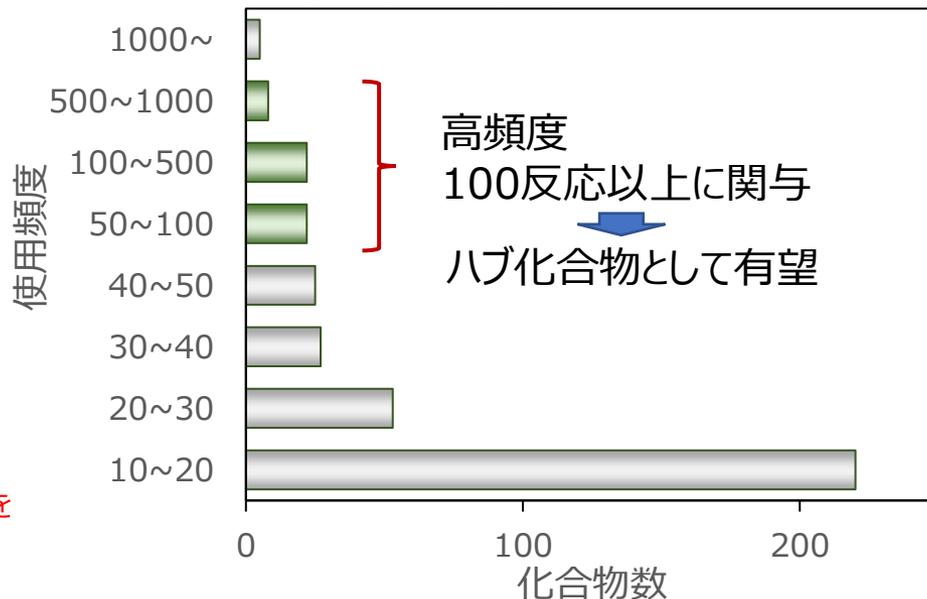
産業ニーズに適応する反応の選定

ハブ化合物候補を網羅的に選定

データベースをもとに化合物の使用頻度を数え上げて、高頻度に使用される代謝産物を選抜



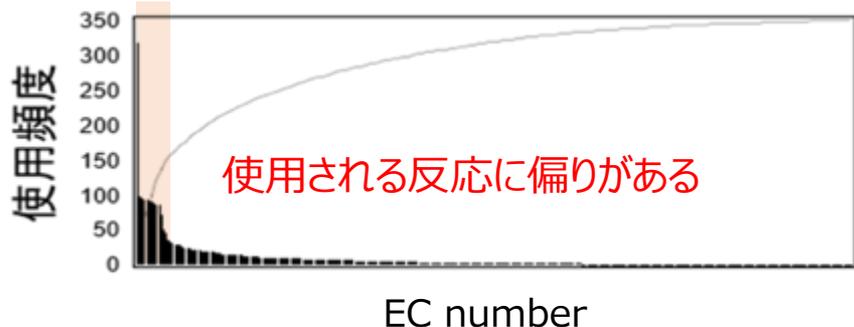
各化合物の使用頻度の違い



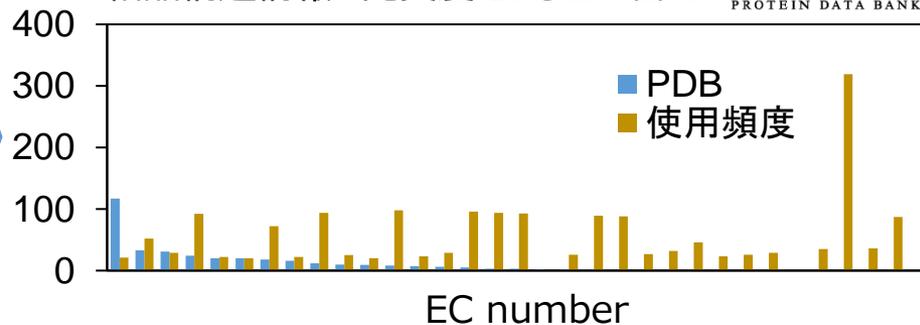
プラットフォームケミカルのラインナップを揃える

データベース空間から産業ニーズの高い反応を選定

産業ニーズの高い各種化合物の生産に関与する反応の使用頻度 (BioProVで予測)



結晶構造情報の充実度による並べ替え



脱炭酸、酸化還元反応などは、ニーズが高い¹³

テンプレート酵素選定ワークフローの開発

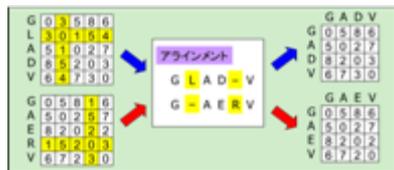
[1] 構造情報に基づく**酵素**のクラスタリング
データベース空間の酵素候補の探索



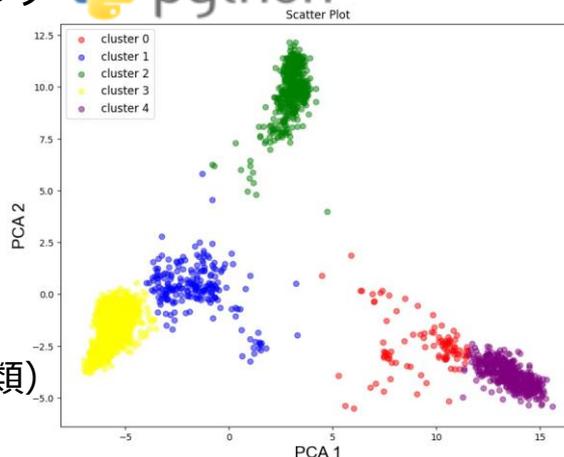
新規アミノ酸配列エンコーディング法



配列データ



- 配列アライメント
- タンパク質配列情報 (>数万種類)の数値化・分類

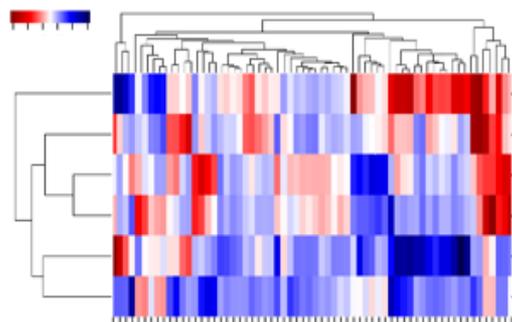


構造の特徴に応じた
重みづけアルゴリズムの検討

Amino Acid
A
R
N
D
C
Q
E
G
L
K
M
F
P
S
T
W
Y
V

特許出願中

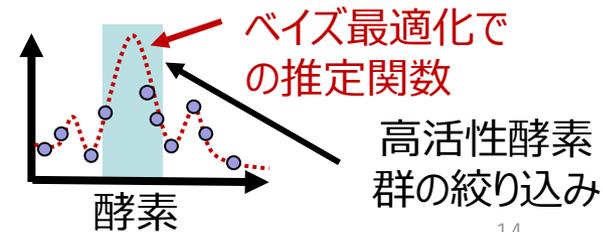
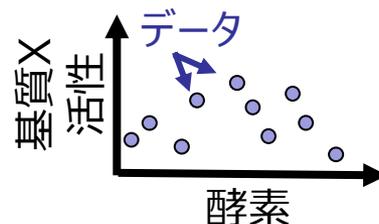
[3] 基質群と酵素群の関連付け



最適な組み合わせの検討
(独自データに基づく組み合わせの探索、
機械学習を利用した探索など)

[2] ハイスループットアッセイ
系によるデータ取得

[4] 情報解析による高活性酵素候補の
絞り込みと、テンプレート酵素候補の選定



ハイスループットアッセイ系の開発

各工程を**自動化**し、膨大量の酵素データを迅速に取得するシステムを構築した。

工程 1 : クローン選抜、植菌、培養

x2 倍速

96ウェルからプレートへ**自動播種**
コロニーの**タグづけデータ管理**
プレートから96ウェル液体培養への**高速植菌**



工程 2 酵素抽出、精製、溶液調製

x10 倍速



ワークフロー特性に対応する拡張性高い**分注操作**

異なるウェルの初期ODまたは酵素濃度を揃えて分注可能

工程 3 : 酵素反応、活性測定

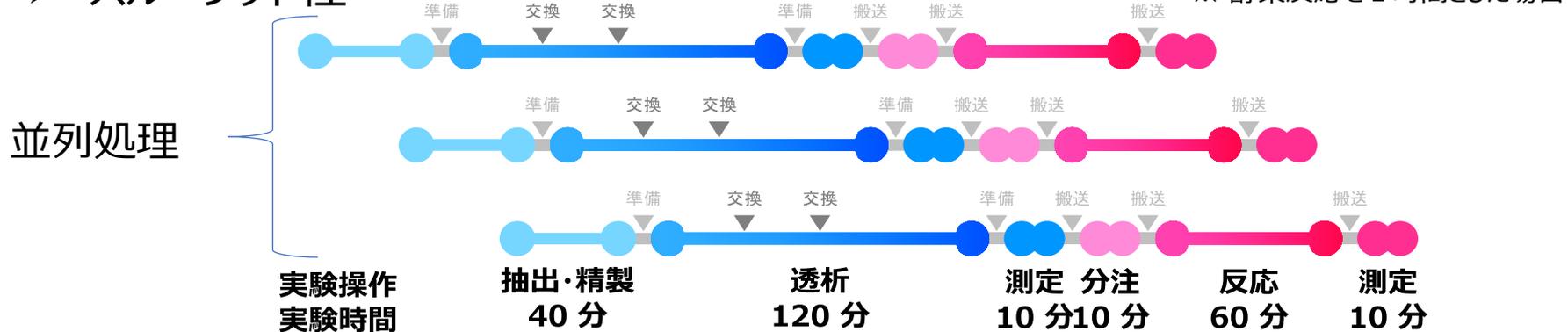
x2 倍速



様々なアッセイ系に対応する拡張性高い**アッセイシステム**

ハイスループットアッセイ系の開発

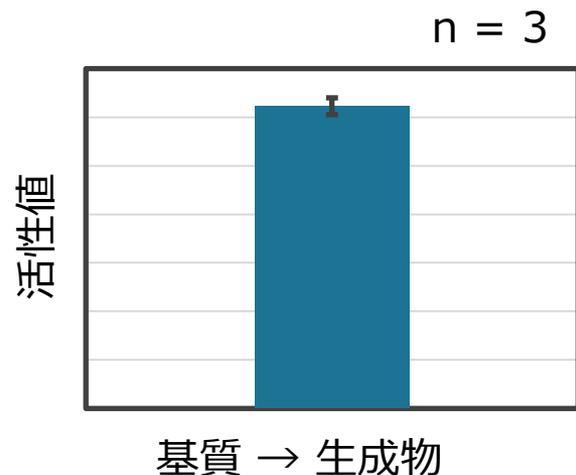
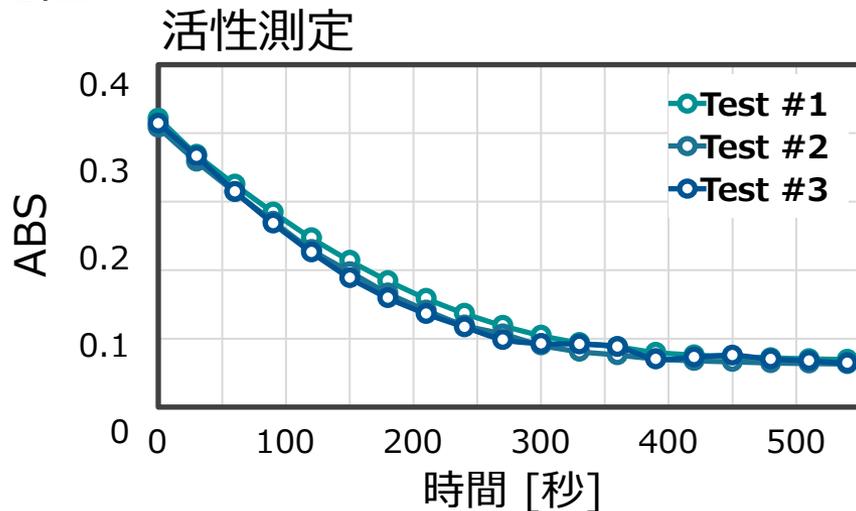
スループット性



(1サイクル：酵素の抽出、精製、調製、試験までの工程)

- 約5時間で96種類の酵素の機能評価が可能
- 約1日の並列処理で2300種類の酵素の機能評価が可能 (人手による搬送含)

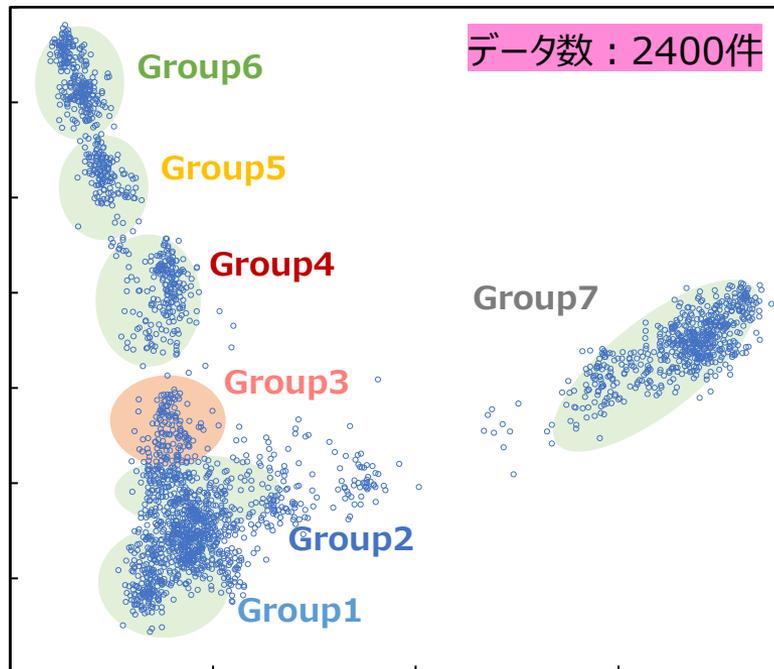
再現性



自動化機器を活用し、独自のアッセイ系を構築することで、**高いスループット性と再現性**を実現した。

テンプレート酵素選定技術の開発

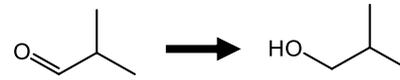
アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)



アミノ酸配列の数値化・データ解析により、膨大な数の配列情報を処理することが可能になり、分類に要する時間を大幅に短縮した。

ADH19種 (Group1~7) × 基質37種
活性値 (k_{cat}/K_m) データセットをハイスループット取得

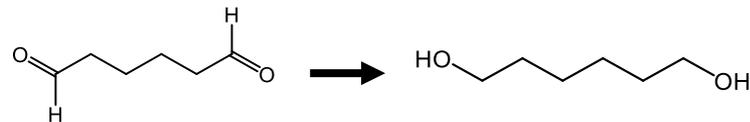
脂肪族: 燃料



芳香族: 香料原料



長炭素鎖: ポリマー原料



Group3の酵素群の特徴

- 1種類の酵素で20種類以上 (脂肪族、芳香族、長炭素鎖) の反応をカバー
- 新規創出系の適応性に繋がる未知反応を発見
- 基質特異性の広さだけでなく、活性値が高い

➤ 分類技術の妥当性を実証した

目的反応を触媒する有用酵素の迅速創製技術

テンプレート酵素を起点として、ニーズに基づく改変で人工酵素を迅速に創出する

まとめ

- ✓ 産業ニーズに適応する反応を選定した。
- ✓ 情報解析に基づくテンプレート酵素選定技術を構築した。
- ✓ 様々な酵素反応に適応可能な拡張性の高いハイスループットアッセイ系を開発した。

本PJ終了後に構築する酵素開発プラットフォーム

