

Title	Production of glycerol-3-phosphate using Escherichia coli recombinants expressing Thermococcus Kodakaraensis KOD1 glycerol kinase and Thermus thermophilus HB27 polyphosphate Kinase
Author(s)	Elvi, Restiawaty
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/26867">https://hdl.handle.net/11094/26867</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【76】

氏名	エルビ レスティアワティ Elvi Restiawaty
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 25467 号
学位授与年月日	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学位論文名	Production of glycerol-3-phosphate using <i>Escherichia coli</i> recombinants expressing <i>Thermococcus Kodakaraensis</i> KOD1 glycerol kinase and <i>Thermus thermophilus</i> HB27 polyphosphate Kinase (Thermococcus Kodakaraensis KOD1 由来グリセロールキナーゼおよび <i>Thermus thermophilus</i> HB27 由来 ポリリン酸キナーゼを発現させた組換え大腸菌によるグリセロール-3-リン酸の生産)
論文審査委員	(主査) 教授 大竹 久夫 (副査) 教授 金谷 茂則 教授 清水 浩 准教授 本田 孝祐

## 論文内容の要旨

Synthetic metabolic engineering (SME) is a novel, simple, and universal strategy which uses heated mesophilic cells having thermostable enzymes as biocatalyst. Heating up the recombinant cells producing thermophilic enzymes at 65-90°C for 15-30 min results in the irreversible denaturation and inactivation of relative unstable indigenous enzyme, which can minimize undesired side reactions. Additionally, the cell membrane barrier of the mesophilic host is partially disrupted by heat treatment so that a better accessibility of substrate to target enzyme can be achieved.

This thesis addresses a feasibility study of the SME-based bioproduction, which particularly focused on an ATP-regenerating reaction catalyzed by *Thermus thermophilus* HB27 polyphosphate kinase (TtPPK). The production of glycerol 3-phosphate (G3P) from glycerol using *Escherichia coli* recombinants having thermophilic enzymes was used as a model reaction. The phosphorylation of glycerol to G3P, catalyzed by an ATP-dependent enzyme of *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 glycerol kinase (TkGK), was coupled with the ATP regeneration system using TtPPK. The objective of this work is to demonstrate the basic advantages of SME, such as the

increase of membrane permeability, no byproduct formation, elimination of complex process control, and the repetitive use of the biocatalyst.

Overview of this thesis can be described as follows: the chapter 2 deals with the feasibility study of ATP-regenerating system of TtPPK in G3P production from glycerol. The heat-treated *E. coli* recombinants having TtPPK were able to regenerate ATP at rates similar to those detected in cell-free extracts, suggesting the exogenous polyP and ADP could freely access TtPPK through the heat-damage cell envelope. More than 80% of TtPPK activity was retained in the heated cells after incubation at least 40 min at 70°C, whereas TkGK was readily released out of the cells. This result indicated that TtPPK was associated to the membrane fraction and could be easily recovered and repetitively used as catalyst. Using the mixture of *E. coli* recombinants expressing TkGK and TtPPK, the production of G3P from glycerol was examined. When polyP was added to the reaction mixture in a fed-batch mode, 100 mM glycerol was stoichiometrically converted to 80 mM G3P (a molar yield of 80%).

The chapter 3 describes the construction of membrane-anchoring fusion proteins of TkGK and their application to repetitive batchwise reactions. In this study, TkGK was fused with either TtPPK or an *E. coli* membrane-intrinsic protein, YedZ, to minimize the heat-induced leakage of TkGK. When the *E. coli* recombinants having these fusion proteins were incubated at 70°C for 2 h, more than 80% of TkGK activity was retained in the heated *E. coli* cells. However, the yield of G3P production by *E. coli* having the fusion proteins of TtPPK and TkGK was only less than 35%. Polyphosphate (polyP) is a strong chelator for metal ions and has an inhibitory effect on TkGK which requires magnesium. Insufficient space between TtPPK and TkGK might enhance the inhibitory effect of polyP on TkGK activity of the fusion protein. The mixture of *E. coli* cells having TtPPK and those having TkGK fused with YedZ converted 80% of glycerol into G3P. These recombinant cells could be easily recovered from the reaction mixture by centrifugation and repeatedly used without a significant loss of enzyme activities.

## 論文審査の結果の要旨

本論文の第1章では化学品生産分野における微生物利用技術の近年の進捗を俯瞰するとともに、その問題点を取り上げ、これを克服するための新たな技術体系として「合成代謝工学」を提案、その技術概要を解説している。

その技術概要としては、まず耐熱性酵素遺伝子を大腸菌などの中温性宿主微生物内で過剰発現させ、得られた組換え菌を70°C程度の熱処理に供した後、触媒としてそのまま利用するというものである。熱処理により、宿主由来酵素の大部分が熱変性により不可逆的に失活し、精製酵素と同レベルの高い選択性を有した生体触媒が容易に得られる。また多くの中温性微生物の細胞外膜構造は熱処理により脆弱化されるため、微生物変換反応でしばしば問題となる基質・生成物の膜透過律速が解消される。本法は異種宿主内での機能的発現さえ可能であれば、あらゆる耐熱性酵素に対して適用可能であり、これらを任意に組み合わせることによって化学品生産のための人工代謝経路が容易に構築可能となる。

実生産レベルでの微生物利用技術の具体例やその技術的課題を最近の知見を引用しつつ、明確に例示できている。また、克服すべき技術的課題について、これまでにないユニークな解決策が提案されており、その概要もシンプルかつ具体的に記述されている。

第2章では、具体的モデル反応を例に挙げ、「合成代謝工学」の技術的利点を実証することに取り組んでいる。モデル反応として取り上げられたのは、好熱性細菌 *Thermus thermophilus* 由来のポリリン酸キナーゼ (TtPPK) による ATP 再生反応である。モデル反応の選定理由として、合成代謝工学では生きた微生物を使用しないため、生体内でのエネルギー通貨となる ATP の供給をいかに担保するかが重要であるため、とする説明は明快かつ妥当である。TtPPK による

ATP 再生能は、超好熱性アーキアである *Thermococcus kodakaraensis* 由来 ATP 依存型グリセロールキナーゼ (TkGK) とのカップリング反応によるグリセロールからのグリセロール 3-リン酸 (G3P) 生産を定量することにより評価されている。実証が試みられたのは、① 加熱による膜透過律速の解消、② 宿主由来酵素の失活と副反応の除去、③ 生細胞を利用しないことによる培養・反応制御の簡略化の3つの潜在的利点である。①、②については、TtPPK、TkGK と同様の機能を有する中温性酵素を比較対象とした実験を実施し、期待された効果を明確に裏付ける実証データを提示することができている。③については、TtPPK、TkGK のカップリング反応を異スケールで実施し、G3P 生産速度を比較している。生細胞を利用した発酵生産では、目的物質の生産効率も微生物の代謝活性に強く依存する。このため通気・攪拌などの操作パラメーターが生産性に及ぼす影響が大きく、この問題は生産プロセスのスケールアップ時に特に大きな問題となる。一方、生細胞を利用しない合成代謝工学は、温度・pH などの単純なパラメーター設定のみでの反応実施が可能と期待される。実験結果によれば、TtPPK、TkGK のカップリング反応を 100  $\mu$ L、100 mL の異なるスケールで実施した際にも、反応速度・最終生産物濃度に有意な差は認められず、本法のマルチスケール性が実証される結果が得られている。なお、本研究で得られた最終生産物濃度 (約 80 mM) はすでに報告されているポリリン酸キナーゼ利用型 ATP 再生反応を用いた様々な物質生産の実施例と比較しても最も高い値である。

第3章では、モデル反応に用いられた TkGK を材料に、可溶性耐熱性酵素の大腸菌膜核分へ偏在化とその繰り返し利用の可否を検討している。第2章にて実施された研究の過程で、筆者は中温性の組換え微生物の加熱処理により細胞外膜構造が脆弱化し、細胞質中に発現させた耐熱性酵素が反応液中に漏出するという問題を見出した。外膜の脆弱化は基質・生成物の膜透過律速の解消という点からは好ましい一面を有する反面、耐熱性酵素の漏出はその優れた熱安定性を十分に発揮させる上では大きなデメリットとなる。本モデル反応で用いられた耐熱性酵素のうち、TtPPK は熱処理後の菌体にも高い割合で保持されていたのに対し、TkGK は 70°C、20 分間の熱処理後でおおよそ 50% が細胞外へと漏出した。これは TtPPK が大腸菌内で膜結合型タンパク質として生産されているためと考えられる。そこで TtPPK、TkGK の融合タンパク質を作成し、これらの酵素活性を菌体内に保持させつつ、カップリング反応を実施させることを試みた。この結果、期待どおり熱処理による酵素の漏出は防がれ、また各酵素の比活性も十分に保たれていた。しかし、本融合タンパク質を発現させた大腸菌を用い、TtPPK、TkGK のカップリング反応を実施したところ、個別の酵素を発現させた大腸菌混合液を用いた場合に比べ、著しく低い G3P 生産量しか得られなかった。この理由として、TtPPK の基質となるポリリン酸が TkGK に強い阻害作用を持つことから、融合タンパク質を用いたカップリング反応では TtPPK とポリリン酸の相互作用のため、ポリリン酸と TkGK が物理的に近接し、阻害効果が顕著にあらわれるためと推察している。TtPPK と TkGK の間にスパーサーとしてポリペプチド鎖を導入した融合タンパク質ではこの阻害効果が緩和されたことからこの推察は妥当と言える。この結果を受け、TkGK を大腸菌由来の膜結合型タンパク質である YedZ との融合タンパク質として発現させる試みがなされている。この場合も期待どおり熱処理による酵素漏出を防ぐことが可能であり、比活性は TkGK 単独発現株の 1/20 程度と低いものの、TtPPK との融合タンパク質のようなポリリン酸による顕著な阻害を受けることなくカップリング反応への利用が可能であった。最終的に、TtPPK 発現大腸菌、ならびに TkGK と YedZ の融合タンパク質を発現させた大腸菌の混合液を用いて繰り返し反応を実施した。70°C、1 時間の回分反応度、遠心分離により菌体を回収・再利用したところ、反応速度をほとんど低下させることなく 3 回にわたる繰り返し利用が可能であった。以上のとおり、本章では可溶性耐熱性酵素の繰り返し利用を可能とするという課題を、膜結合型タンパク質との融合化というアプローチにより解決している。

最後に第4章において、筆者は本研究で得られた成果を総括するとともに、耐熱性酵素群の組換え菌体内での空間的配置の整合化など合成代謝工学の利用可能性をさらに押し広げるために有効となろう技術的課題を提唱し、本論文の結言としている。

以上のように、本論文は微生物による化学品生産技術のための新たなアプローチとして「合成代謝工学」という手法を提案するとともに、本法に期待される技術的利点を検証したものである。いずれも慎重に立案された研究手法に基づいたものであり、結果に対する考察も十分になされている。本論文によって導かれた成果は、近年、注目の高

いバイオマス利用技術の分野において、既存の方法では克服できなかった諸問題に新たな解決策を提供しうる方法として大いに期待できよう。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。