

Title	Development of a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway, synthetic metabolic engineering
Author(s)	Ye, Xiaoting
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27571
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	叶 晓 婷 (Ye Xiaoting)
博士の専攻分野の名称	博士 (工学)
学位記番号	第 26151 号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 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	Development of a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway, synthetic metabolic engineering (合成代謝工学—キメラ型代謝経路構築のための簡便かつ新たな技術の開発)
論文審査委員	(主査) 教授 大竹 久夫 (副査) 教授 福崎 英一郎 教授 村中 俊哉 准教授 本田 孝祐

論文内容の要旨

The integration of biotechnology into chemical manufacturing has been recognized as a key technology to build a sustainable society. However, the practical applications of biocatalytic chemical conversions are often restricted due to their complexities involving the unpredictability of product yield and the troublesome controls in fermentation processes. One of the possible strategies to overcome these limitations is to eliminate the use of living microorganisms and to use only enzymes involved in the metabolic pathway. The use of recombinant mesophiles producing thermophilic enzymes at high temperature results in denaturation of indigenous proteins and elimination of undesired side reactions; consequently, highly selective thermophilic biocatalytic modules comparative to the purified enzymes can be readily prepared. By rationally combining those modules together, artificial synthetic pathways specialized for chemical manufacturing could

be designed and constructed. In this thesis, the author developed this novel, simple technology and designated it as “synthetic metabolic engineering”.

To construct such an artificial pathway, four steps are included: 1) appropriate selection of thermostable enzymes; 2) expression in mesophilic hosts (*e.g.*, *Escherichia coli*); 3) preheating of the cell suspension at high temperature (typically at 70°C for 30 min) to disrupt the cell membrane and to inactivate the indigenous host enzymes; and 4) rational combination of those catalytic modules at adequate ratio to achieve the stoichiometrical conversion.

Chapter 2: Construction of a non-ATP-forming Embden-Meyerhof (EM) pathway and its application in lactate production

A chimeric EM pathway with balanced consumption and regeneration of ATP and ADP was constructed by using a mixture of nine recombinant *E. coli* strains, each one of which overproducing either one of the seven glycolytic enzymes of *Thermus thermophilus*, the cofactor-independent phosphoglycerate mutase of *Pyrococcus horikoshii*, or the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Thermococcus kodakarensis*. By coupling this pathway with the *Thermus* malate/lactate dehydrogenase, a stoichiometric amount of lactate was produced from glucose with an overall ATP turnover number of 31.

Chapter 3: Direct conversion of glucose to malate by synthetic metabolic engineering

Chapter 3 focused on the applicability of synthetic metabolic engineering to the direct conversion of glucose to malate. Reversible carboxylation of pyruvate catalyzed by the malic enzyme ($\Delta G^{\circ} = +7.3 \text{ kJ mol}^{-1}$) derived from *T. kodakarensis* was coupled with the thermodynamic favorable non-ATP-forming EM pathway to achieve the redox balance and to shift the overall equilibrium towards malate production ($\text{glucose} + 2 \text{ HCO}_3^- \rightarrow 2 \text{ malate} + 2 \text{ H}_2\text{O}$, $\Delta G^{\circ} = -121.4 \text{ kJ mol}^{-1}$). The enzyme was observed to exhibit both pyruvate carboxylation ($\text{pyruvate} + \text{HCO}_3^- + \text{NADPH} \rightarrow \text{malate} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$) and pyruvate reduction ($\text{pyruvate} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{lactate} + \text{NADP}^+$) activities. By increasing the HCO_3^- concentration, the reaction specificity could be redirected to the malate production. As a result, direct conversion of glucose to malate can be achieved with a molar yield of 60%.

Chapter 4: Conclusions

This work demonstrated a wide applicability of synthetic metabolic engineering to the production of desired metabolite on demand with thermodynamic prediction of the production yield. The concept of *in vitro* synthetic-pathway biotransformation is not new but its feasibility in practical application has been largely restricted mainly owing to the prejudice that *in vitro* biotransformation is too costly for producing low-value biocommodities. However, the comparative cost analysis between *in vivo* and *in vitro* fermentation processes demonstrated that this interpretation is not necessarily true and that the development of stable

standardized enzyme modules will provide economical advantages to the use of *in vitro* systems.

Synthetic metabolic engineering enables a one-step preparation of highly selective and stable biocatalytic modules via simple heat-treatment of the recombinant mesophiles having thermophilic enzymes. More importantly, it is, in principle, applicable to all thermophilic enzymes as long as they can be functionally expressed in the host, and thus would be potentially applicable to the biocatalytic manufacture of any chemicals or materials on demand.

論文審査の結果の要旨

微生物およびそれらに由来する酵素などの生体触媒を利用した化学品生産プロセス、いわゆるバイオプロセスは、バイオテクノロジーの主要な産業応用例のひとつである。エネルギー問題への関心の高まりから、化学品生産の場においても化石資源に依存した産業構造からの脱却が求められており、バイオ燃料生産に代表されるように再生可能資源を出発物質とした有用化学品生産のためのバイオプロセス開発に力が注がれている。これらの開発研究例のうち、各種オミクス解析により得られた情報をベースに、微生物ゲノムを人為的に改変し、所望の化学品を高効率に生産させるための「微生物工場」を構築する一連の技術体系は、近年、「代謝工学」とも呼ばれ、バイオプロセスの応用範囲を押し広げるものとして大きな注目を集めている。一方、代謝工学的アプローチをはじめ、生きた微生物を化学品生産のための触媒とする発酵生産においては、目的物質の高い生産効率とその再現性を両立させるためには複雑な培養制御が必要とされ、化学品生産の場に生体触媒反応を導入するにあたっての大きな障壁となっている。本論文の第1章では、代謝工学的手法による化学品生産の実例を紹介するとともに、既存の発酵生産技術のメリット・デメリットが俯瞰されている。さらにそのデメリットを解消し、バイオプロセスの利便性を高めるための新技術として、本論文の骨子となる新技術、「合成代謝工学 (synthetic metabolic engineering)」の概略が述べられている。合成代謝工学とは、目的物質生産のための代謝経路を構築する必要最小限の酵素群を *in vitro* で合理的に組み合わせ、化学品生産に特化した人工代謝経路を構築しようとするものであり、既存の発酵生産に見られる「生きた微生物を取り扱う」がゆえの煩雑性を解消することを最大の目的とする。本章でも触れられているとおり、単離酵素を用いた *in vitro* の人工代謝経路構築に関する報告例はこれまでも複数散見されるが、この際、問題となるのは、複数の代謝酵素を副反応が無視できるレベルにまで精製する作業の手間とコストであった。これに対し、合成代謝工学では、代謝酵素のソースを(超)好熱菌とし、まずこれらの遺伝子を大腸菌などの汎用的な中温性細菌で過剰発現させる。得られた組換え中温菌体を加熱処理に供したのち、人工経路構築のための触媒モジュールとしてそのまま使用する。加熱処理により、宿主由来の酵素タンパク質のほとんどは不可逆的に失活するため、精製酵素と同レベルの高い選択性を有した耐熱性生体触媒モジュールが簡便に調製可能となる。

第2章、および第3章では、合成代謝工学的アプローチが実際の化学品変換に利用可能であることを実証すべく、独自にデザインされた人工経路の構築と動作確認が行われている。このうち、第2章では異なる(超)好熱菌に由来する複数の解糖系酵素群をアセンブルすることにより、ATP/ADP 収支の合致した(すなわち ATP を生成しない)キメラ解糖系を構築し、本経路を通じたグルコースからの乳酸生産が可能であることを実証している。ATP/ADP や $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ などの各種補酵素の *de novo* 合成能力を有さない *in vitro* 代謝システムでは、構築した経路内でこれらの消費/再生のバランスを合致させることが重要である。本章では、好熱性細菌である *Thermus thermophilus* 由来の解糖系 (Embden-Meyerhof 経路、EM 経路) 酵素群のうち、ATP 生産に携わる酵素反応を、超好熱性アーキアである *Thermococcus kodakarensis* 由来の non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN) で置換することにより、経路内での ATP および ADP の消費と再生のバランスがはかられている。結果的に、本経路を通じてグルコースから乳酸への変換反応が収率 100% で達成され、期待どおり ATP/ADP の経路内ターンオーバーが可能であることが実証されている。これら基幹コンセプトの実証に加え、人工経路中の代謝流束最適化法の確立、耐熱性酵素

の合理的選択によるアロステリック阻害の回避など、研究過程で示された各々の知見は、今後、合成代謝工学的アプローチによる、より多彩な人工経路の構築に向けての重要な礎となろう。

第3章では、前章にて構築された ATP 非生産型のキメラ解糖系にピルビン酸への還元的炭酸固定反応を触媒するマリックエンザイムをカップリングさせることで、グルコースからのリンゴ酸生産に取り組んでいる。マリックエンザイムによる触媒反応は、正の自由エネルギー変化 ($\Delta G_{0'} = +7.3 \text{ kJ/mol}$) を伴うものであるため、反応平衡は脱炭酸反応側に大きく傾いている。一方、構築されたキメラ型解糖系は、ATP の生産を伴わないため、通常の解糖系に比べより大きな負の自由エネルギー変化 ($\Delta G_{0'} = -136 \text{ kJ/mol}$) を伴う。従って、両者をカップリングさせることにより、マリックエンザイムが触媒する反応を炭酸固定反応側にシフトさせることが可能となる。必要十分数の酵素モジュールのみから経路を構築する合成代謝工学では、副生物としての種々の代謝産物の生成や、通常の発酵生産では不可避な菌体増殖が伴わないため、有機合成反応と同様に熱力学的な反応収率の予測が可能であることが示された点は非常に意義深い。同章では、さらにマリックエンザイムによる炭酸固定反応の基質が二酸化炭素ではなく重炭酸イオンであること、また同酵素が重炭酸イオン非依存的なピルビン酸の還元による乳酸生産をも触媒しうることなど、化学品生産にマリックエンザイムを応用するにあたって重要となろう知見を副次的に得ることに成功している。

第4章ではこれらの結果を総括し、既存の発酵生産技術の欠点を解決しうる技術としての合成代謝工学のフィージビリティについて議論している。上述のとおり、精製酵素を用いた *in vitro* での人工経路構築とこれらを用いた物質生産に関してはすでに複数の報告がなされている。これらの報告のうち、*in vitro* 人工経路の実生産への応用可能性を評価するパラメーターとして各酵素の総括のターンオーバー数 (total turnover number, TTN) について言及した報文を引用し、本博士論文で構築された経路における耐熱性酵素群の TTN が既存の発酵生産技術を凌駕しうるレベルにあることを示している。

以上のように、本論文はバイオプロセスにおける諸問題への解決策として、「合成代謝工学」という新たな技術体系を提案するとともにその応用可能性を明示したものであり、同分野の研究者に大きなインパクトを与えうるものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。