



Title	In vitro production of n-butanol from glucose
Author(s)	Krutsakorn, Borimas
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/34461">https://hdl.handle.net/11094/34461</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## Synopsis of Thesis

Title: *In vitro* production of *n*-butanol from glucose  
(*In vitro*におけるグルコースからの*n*-ブタノール生産)

Name of Applicant: Borimas Krutsakorn

## Chapter 1: Introduction

Butanol, the next-generation biofuel with an energy density (27 MJ/L) comparable to gasoline (32 MJ/L), was traditionally produced by acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using *Clostridium acetobutylicum*. However, clostridia are strict anaerobes and have a complicated life cycle involving spore formation; therefore, unfavorable complex operational controls are indispensable in the conventional ABE fermentation process. This limitation has motivated many researchers to install a butanol production pathway in heterologous microorganisms; however, these attempts often suffer from flux imbalances caused by as yet unidentified regulatory mechanisms of natural metabolisms. One of the possible strategies to overcome this problem is to construct the simplified model of the pathway-of-interest *in vitro* using only the limited number of enzymes. The heat-treatment of recombinant mesophiles having heterologous thermotolerant enzymes enables the one-step preparation of biocatalytic modules that are as highly selective as purified enzymes. By rationally combining those modules, *in vitro* metabolic pathways specialized for chemical manufacturing could be designed and constructed.

Chapter 2: *In vitro* production of *n*-butanol from glucose

The *in vitro* production of *n*-butanol from glucose was achieved through a newly designed, cofactor-balanced, and oxygen-insensitive pathway consisting of 16 thermotolerant biocatalytic modules. *In vitro n*-butanol pathway was constructed by combination of 3 pathways involving 1) chimeric glycolytic pathway (Ye et al., 2012 Microbial Cell Fact 11:120), 2) bypassed pyruvate decarboxylase pathway, and 3) artificial *n*-butanol production pathway. Pyruvate could be converted to acetyl-CoA through the bypassed pyruvate decarboxylation pathway, which is consisting of the pyruvate decarboxylase from *Acetobacter pasteurianus* and the CoA-acylating aldehyde dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. Furthermore, to avoid the use of highly-oxygen sensitive butyryl-CoA dehydrogenase/EtfAB, the author designed an alternative pathway by reordering the reduction round of crotonyl-CoA using the CoA-acylating aldehyde dehydrogenase and NADH-dependent flavinooxidoreductase of *T. thermophilus*. Through the optimized pathway, the direct conversion of glucose to *n*-butanol ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{C}_4\text{H}_9\text{OH} + 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ;  $\Delta G^{\circ} = -282 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) could be produced with a molar yield of 82% (mol *n*-butanol/ mol glucose) at a rate of  $8.2 \mu\text{mol l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

### Chapter 3: Conclusions

The heat treatment of recombinant mesophiles having heterologous thermotolerant enzymes results in the one-step preparation of highly selective biocatalytic modules. The assembly of these modules enables us to readily construct an artificial metabolic pathway *in vitro*. The metabolic flux through this *in vitro* pathway could be spectrophotometrically monitored in real time, which enabled us to experimentally optimize the level of each enzyme to achieve the desired production rate. Our approach would be widely applicable to the rational optimization of artificial metabolic pathways as well as to the *in vitro* production of value-added biomolecules.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (ボリマス クルサコーン Borimas Krutsakorn )			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	教 授	大竹 久夫
	副 査	教 授	福崎 英一郎
	副 査	教 授	清水 浩
	副 査	准教授	本田 孝祐

## 論文審査の結果の要旨

環境問題・エネルギー問題への関心の高まりから、再生可能資源であるバイオマスを原料とした燃料性物質生産、いわゆるバイオ燃料生産分野における技術開発には、大きな期待と注目が寄せられている。バイオ燃料生産では、多くの場合、微生物や酵素などの生体触媒が利用される。この理由として、原料であるバイオマスもまた生体由来分子であり、生体触媒反応とのアフィニティーが高いことも挙げられようが、最大の要因は、化石燃料に比べ圧倒的に豊富な化学物質の混合物であるバイオマスを所望の化学品へと変換するためには、化学触媒に比べ高い反応選択性を有した生体触媒を用いた方が有利であるためと説明できる。すでにブラジルやアメリカなどを中心にサトウキビやトウモロコシを原料としたバイオエタノール生産は実用化されており、大きな市場を築くに至っている。また、食糧問題に対する懸念から非可食性バイオマスを原料としたエタノール生産に関する研究も活発になっている。さらに近年では、エタノール (27 MJ/L) に比べエネルギー密度が高いブタノール (32 MJ/L) をバイオマスから生産しようという試みも盛んである。

微生物によるブタノール生産は、従来アセトン/ブタノール/エタノール (ABE) 発酵菌である *Clostridium* 属細菌が用いられてきた。しかし、偏性嫌気性で孢子形成能を有する *Clostridium* 属細菌の複雑な生活環は、しばしばこれらを工業利用する上での大きな足かせとなっている。そこで同細菌のゲノムを人為的に改良し、工業利用に不適な形質を取り除く、あるいは *Clostridium* 属細菌のブタノール生産経路を構成する酵素遺伝子群を、大腸菌のような簡便に利用できる異種微生物内に移植するといった手法が汎用される。同様の手法は、すでに大規模実用化が行われているエタノール生産などでも広く利用されており、一連の方法論とそれに必要な知見は「代謝工学」という新たな学問分野として認知されつつある。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では、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、上記のように、バイオ燃料、特にブタノール生産についての世界的な研究の潮流を紹介するとともに、既存の発酵生産技術のメリット・デメリットを俯瞰している。さらにそのデメリットを解消するアプローチとして、学位申請者らのグループで開発が進められる「*in vitro* 代謝工学 (*in vitro* metabolic engineering)」が提案され、その概略が述べられている。*In vitro* 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。本論文でも触れられているとおり、単離酵素を用いた *in vitro* での人工代謝経路構築に関する報告例はこれまでに複数散見されるが、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、本論文では、代謝酵素のソースを（超）好熱菌としている。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章では、本手法を用い、実際に *in vitro* でグルコースからブタノールまでの生産を実施した研究成果が述べられている。*Clostridium* 属細菌のブタノール生産経路を *in vitro* で再構築した場合、グルコース 1 分子からブタノール 1 分子が生成される過程で 2 分子の ATP が生成される。しかし、ATP/ADP や NAD(P)<sup>+</sup>/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必要がある。そこで本研究では、好熱性細菌由来の解糖系（Embden-Meyerhof 経路、EM 経路）の一部を超好熱性アーキアが有する変形 EM 経路由来酵素で置換した ATP 非生産性キメラ型解糖経路を利用している。また、多数の酵素が細胞内に内包された生体内とは異なり、各酵素が反応液中で自由拡散する *in vitro* の系では、酵素間の相互作用頻度が低くなることから、電子授受などのためパートナータンパク質を必要とする酵素群は利用できないとの考察のもと、天然型ブタノール生産経路の改変に取り組んでいる。具体的にはピルビン酸からアセチル CoA に至る一連の反応をピルビン酸デカルボキシラーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼの 2 種類の酵素反応で迂回させている。また、同様にブタノールの前駆体であるクロトニル CoA に対する一連の還元反応の順序を入れ替えることでパートナータンパク質を要する酵素反応の使用を避けることにも成功している。さらに吸光度測定をベースに、*in vitro* 経路の代謝流束をリアルタイムで測定し、所望の流束を得るための酵素濃度を実験的に最適化させる方法論を提案している。結果として 16 種類の酵素反応からなる *in vitro* 代謝経路の構築とその最適化を通じて、生産速度 8.2 mmol/L/min、収率 82% (mol/mol) という世界最高水準でグルコースからブタノールを生産することに成功している。

第3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 *in vitro* 代謝工学の応用可能性について議論している。上述のとおり本論文では、世界最高レベルのブタノール生産速度・収率を実現する。しかし、その一方、長時間利用時の生産システムの安定性に難を有し、最終的な生産物濃度は低い値にとどまっている。その原因として酸化還元補酵素である NAD(H) の高温条件下での不安定性を指摘するとともに、この課題を解決するための将来的な研究指針についても言及している。

以上のように、本論文はバイオ燃料生産という注目度の高い研究分野において、*in vitro* 代謝工学という新たな技術体系を提案し、そのパフォーマンスを示すとともに将来的な応用可能性にまで言及したものであり、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。