



Title	Improvement of the operational simplicity of in vitro bioconversion systems with thermophilic enzymes
Author(s)	Pham, Huynh Ninh
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52118
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (Pham Huynh Ninh)

Title	Improvement of the operational simplicity of <i>in vitro</i> bioconversion systems with thermophilic enzymes (好熱菌由来酵素を用いたインビトロでの有用物質生産システムの簡略化に関する研究)
-------	--

Abstract of Thesis

Chapter 1: Introduction

Enzymatic cascade reactions, in which a certain number (typically more than 3) of enzymes are combinatorially used in a single batch, has been applied to the production of a variety of industrial chemicals at a lab scale. This approach, designated as *in vitro* metabolic engineering, offers some distinct advantages over conventional fermentation-based processes such as great flexibility, high product yields without by-products, fast reaction rates, broad reaction conditions, and industrial scalability. In spite of these potential advantages, *in vitro* metabolic engineering has not yet come into a practical use owing to four major obstacles, namely (i) low-cost enzyme production, (ii) prolonged enzyme stability, (iii) cofactor engineering, and (iv) pathway optimization and modeling. The employment of thermotolerant enzymes would be the possible solutions for some of these limitations. A simple heat-treatment of recombinant mesophilic cells (e.g., *Escherichia coli*) harboring thermophilic enzymes results in the denaturation of indigenous proteins and enables one-step preparation of highly selective thermotolerant biocatalytic modules without costly and time-consuming procedure for enzymes purification. This study aimed to further improve the operational simplicity of thermophilic-enzyme-based *in vitro* metabolic engineering with particular focuses on (1) prevention of the thermolysis of *E. coli* cells and (2) co-expression of multiple thermophilic enzymes in a single recombinant cell.

Chapter 2: Development of a continuous bioconversion system using a thermophilic whole-cell biocatalyst

The recombinant *E. coli* cells harboring the thermophilic fumarase from *Thermus thermophilus* were treated with a low concentration of glutaraldehyde (GA) to prevent the heat-induced leakage of the enzyme. The membrane permeability of GA-treated *E. coli* cells to relatively small molecules could be improved by heat treatment whereas the overall structure of the cells was not apparently changed. The GA-treated *E. coli* cells having the thermophilic fumarase were used for the hydration of fumarate to malate in a continuous reactor for more than 600 min with a molar conversion yield of 60% or higher.

Chapter 3: Assembly and multiple gene expression of thermophilic enzymes in *Escherichia coli* for *in vitro* metabolic engineering

Genes encoding nine thermophilic enzymes involved in a non-ATP-forming chimeric glycolytic pathway were co-expressed in a single recombinant *E. coli* strain by assembling them in an artificial operon. The cell-free extract of the multiple-gene-expression *E. coli* showed higher specific activities of the thermophilic enzymes compared to those in an enzyme cocktail prepared from a mixture of single-gene-expression strains, in each of which one of the nine thermophilic enzymes was overproduced. By heating the crude extract of the multiple-gene-expression cells at 70°C, a full set of glycolytic pathway enzymes was prepared and used for the stoichiometric conversion of glucose to lactate.

Chapter 4: Conclusions

The thermolysis of *E. coli* cells could be prevented by a pretreatment with GA. The GA-treated cells harboring thermophilic fumarase could be applied in a continuous bioconversion system for the hydration of fumarate to malate. The assembly and co-expression of multiple enzymes in single *E. coli* cell could also be demonstrated. Genes encoding for nine thermophilic enzymes involved in the non-ATP-forming chimeric glycolytic pathway have been assembled in an artificial operon and functionally expressed in a single *E. coli* cell. Through a heat-treatment (70°C, 30 min) of the crude extract of the recombinant cells, one-step preparation of the cocktail of enzyme-of-interests could be achieved. Stoichiometric conversion of glucose to lactate was demonstrated using the resulting enzyme cocktail.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (Pham Huynh Ninh)		
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査	教授 大竹 久夫
	副査	教授 原島 俊
	副査	教授 仁平 卓也
	副査	准教授 本田 孝佑

論文審査の結果の要旨

酵素は、生物の代謝を支える生体触媒としてだけでなく、食品加工や化学品合成といった産業分野でも広く利用されている。産業用触媒として利用される酵素は、多くの場合、微生物から単離精製された後、単独もしくは2種類程度の組み合わせにより用いられる。一方、近年では3～十数種類程度の酵素を同時に利用し、生体内における代謝反応のような多段階反応を单一の反応ポット内で進行させ、高収率な物質変換を達成しようという試みも盛んに報告されている。本論文では、このような新規技術を *in vitro* 代謝工学と称している。これは人為的に代謝経路を改変した微生物を用いて有用物質を発酵生産させる代謝工学のアナロジーと位置づけられる。多数の共存酵素が内包される微生物細胞を用いる既存の代謝工学的手法に比べ、必要最低限の酵素のみを用いる *in vitro* 代謝工学は、副反応の抑制による反応収率の向上などの利点を有する。その反面、酵素の単離精製に煩雑な操作が必要とされる、いったん失活した酵素が再生されないなどといった欠点を有する。

本論文の第1章では、酵素の産業利用についての現状を幅広く総括するとともに、酵素の新たな利用法のひとつとして *in vitro* 代謝工学に言及している。また *in vitro* 代謝工学の欠点を軽減する方法として、好熱菌由来の耐熱性酵素を用いた先行研究の例を取り上げるとともに、本法の利便性をさらに高めるために解決されるべき技術的課題が提案されている。具体的には、(1)宿主微生物細胞が高温で熱溶菌を起こすことによる耐熱性酵素の漏出、(2)複数の耐熱性酵素を調製するための操作の煩雑性、の2つが問題点として挙げられており、これらの課題を解決する新たな方法論の開発が本論文の主題として位置付けられている。

耐熱性酵素を用いた *in vitro* 代謝工学の一連のスキームは、以下のとおりとなる。(1)好熱菌に由来する耐熱性酵素遺伝子を大腸菌などの中温性微生物内に導入し、目的酵素を発現させる。(2)この組換え菌を70°C程度の熱処理に供することにより宿主微生物に由来する酵素を熱変性させ、目的の耐熱性酵素の触媒活性のみが残存した触媒モジュールとする。(3)これらのモジュールを適宜組み合わせて所望の物質を生産するための人工代謝経路を構築する。この際、ステップ2の熱処理によって、大腸菌などの中温性微生物は熱溶菌を起こす。この結果、細胞内で生産された耐熱性酵素は反応液中へと漏出するため、本法で調製された酵素モジュールを繰り返し反応や連続反応に適用することは困難であった。その解決策として、本論文の第2章では、架橋化剤による組換え大腸菌の熱溶菌の防止と耐熱性酵素モジュールの連続利用を目指した研究成果について述べている。タンパク質架橋化剤として汎用されるグルタルアルデヒド(GA)で組換え大腸菌の菌体を処理することで熱溶菌が防がれることを示すとともに、GA濃度に応じて漏出防止効果が高まるのと相反して残存酵素活性が低下するトレードオフの関係を見出している。フマル酸水和酵素反応をモデルに十分な漏出防止効果と残存酵素活性を両立しうるGA濃度を実験的に決定し、以下、同条件で処理された菌体について電子顕微鏡観察、膜透過性試験を行い、その特性を評価している。これらの結果に基づき、GA処理菌体を触媒とした繰り返し反応、連続反応を実施し、最大640分間の長期間にわたり高い生産収率が維持されることを実証している。

次いで、第3章では *in vitro* 代謝工学における触媒モジュール調製時の煩雑性を解消することを目的とした研究成

果について報告されている。In vitro 代謝工学では、特定の目的物質を生産するために、複数の触媒モジュールを個別に調製する必要があり、单一の反応ポット内で多段階反応が実施可能な生体触媒反応の利点を十分に活かしきれているとは言い難かった。この問題を解決するため、本章では、複数の耐熱性酵素を单一の大腸菌内で共発現させた組換え株を作成するとともに、これを熱処理に供することで目的的酵素群を簡便に調製する方法について検討している。先行研究において 9 種類の酵素を個別に組み合わせることで構築されたキメラ解糖経路をモデルに、これらの酵素遺伝子を人工オペロンの形でプラスミドベクターに集積し、单一の大腸菌内で発現させている。この際、先行研究で決定された 9 つの酵素の最適量比に近似した発現量比を共発現株内で再現するため、あらかじめ各酵素の必要量と生体内でこれを生産させるために必要とされる mRNA 量を実験的に決定し、その結果に準じて人工オペロン内での各酵素遺伝子の配置を決定している。得られた共発現株を熱処理ののち、触媒として用いることでグルコースから乳酸への单一反応ポット内での変換が高い収率で達成できることを実証している。

第 4 章は、第 2~3 章で述べられた研究成果を総括するものである。第 3 章で構築された共発現株に対し、第 2 章で述べられた GA 処理を施すことにより、繰り返し利用時における共発現株の触媒効率を評価している。GA 処理を行わない場合に比べ、処理菌体は繰り返し利用時の触媒活性の持続性に優れることが認められており、本論文で得られた研究成果の有用性を追実証する結果となっている。また本論文で示された研究成果に基づく将来展望ひとつとして、共発現株の細胞破碎液と限外ろ過を組み合わせた新たな連続反応システムの可能性についても言及されている。

以上のように、本論文は in vitro 代謝工学という萌芽的技術を産業応用可能なレベルに引き上げるため、主として操作の簡便化という観点から改良を試みた成果について記されたものである。個々の研究成果とそこから導き出された考察はいずれも本技術の将来的な産業応用に向けた指針を与えるものであり、その学術的価値も高い水準にあると判断できる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。