The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Designing Escherichia coli Cells for Accumulation of Metabolites through Redox Reactions
Author(s)	Suryadarma, Prayoga
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59856
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【34】

氏　　名	SURYADARMA PRAYOGA（スリヤダルマ プラヨガ）
博士の専攻分野の名称	博　士（工学）
学 位 記 番 号	第　２５６８２　号
学位授与年月日	平成 24 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 基礎工学研究科物質創成専攻
学 位 論 文 名	Designing Escherichia coli Cells for Accumulation of Metabolites through Redox Reactions （酸化還元反応を介した代謝物生産のための大腸菌細胞設計）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　田谷　正仁 （副査） 教　授　賽川　浩一郎　　教　授　馬越　　大

論 文 内 容 の 要 旨

The *E. coli* metabolism was regulated for production of reduced metabolite under an aerobic culture by designing genetic structure and cultivation condition, as internal and external factors, respectively. Chapter 1 deals with investigating the effect of single deletion of genes involved in acetate synthetic pathways on inducing pyruvate accumulation. The deficiency of *pta* or *poxB* genes enhanced the pyruvate production. Although *rpoS* contributed to acetate overflow formation, the disruption of this regulator gene did not affect the elevating pyruvate generation. The *E. coli* cells lacking of this gene mainly directed the carbon flux toward TCA cycle. Chapter 2 describes that the introduction of formate dehydrogenase (FDH) from *Mycobacterium vaccae* into *E. coli* with formate feeding enhanced the accumulation of pyruvate by the regeneration of NADH and CO_2 from NAD^+ and formate. It was worthy of note that the examined oxygenation level of the culture was high enough to inactivate lactate dehydrogenase of *E. coli*, which was of benefit to pyruvate accumulation without lactate as a by-product. In Chapter 3, an intracellular NADH level of *pta*-deficient mutant of *E. coli* harboring alanine dehydrogenase from *Geobacillus stearothermophilus* was regulated by introducing FDH pathway under an aerobic culture with formate feeding to enhance the production of alanine, as the target metabolite. The induction of NADH availability by supplementing the medium with formate increased the accumulation of alanine under an aerobic condition. The higher alanine production was further achieved by means of additional formate feeding and enrichment of oxygenation in the course of culture while suppressing the accumulation of pyruvate and lactate. The outcomes presented in this work give a possible application for producing other reduced metabolites derived from pyruvate by the aerobic cultivations of genetically engineered *E. coli* cells.

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

微生物発酵生産において，好気培養条件下での代謝産物の生産性向上を目的とし，特に微生物細胞内の酸化還元状態の制御に着目して，ピルビン酸などの物質生産に与える影響を評価した．まず，大腸菌を対象として，好気的かつグルコース濃度の高い培養条件にて，種々の遺伝子欠損が中枢代謝活性に与える影響を確認したところ，酸化ストレス応答遺伝子である*rpoS*の欠損によって，好気的な代謝経路が活性化され主要な代謝副生産物である酢酸の生成が顕著に抑制されることを明らかにした．また，細胞内の酸化還元状態を制御する新規な手法として，*Mycobacterium vaccae* 由来のギ酸脱水素酵素を遺伝子組換えにより大腸菌に導入して培地中に直接ギ酸を添加する培養システムを提案した．この組換え大腸菌の培養を実際に行ったところ，好気的な条件において種々の代謝産物の前駆体であるピルビン酸を高収率で生産することに成功した．さらに，この培養条件において，ピルビン酸から酢酸への生成反応を１ステップ欠損させることで，ピルビン酸のみを選択的に生産できることを示した．次の段階として，ピルビン酸を前駆体としその還元反応により生成される還元型代謝産物の一例として，アミノ酸の一種であるアラニンの生産に着目した．*Geobacillus stearothermophilus* 由来のアラニン脱水素酵素をギ酸脱水素酵素と同時に大腸菌に導入し，ピルビン酸からアラニンへの直接変換を行ったところ，酸素供給条件とギ酸供給の量，時間を適正に設定することで非常に高い

アラニンの生産性を達成することができた．また，生産されるアラニンの濃度は培養中に加えるギ酸の濃度やタイミングによって制御できることを示した．

以上，本論文は，微生物発酵生産において，好気培養条件における酸化還元制御の重要性を提示すると同時に，遺伝子組換え手法を駆使して細胞内代謝をデザインすることで微生物培養工学に関する新たな知見を与えるものであり，博士（工学）の学位論文として価値のあるものと認める．