

| | |
|---------------|---|
| | ぶい ほあん だん ろん |
| 氏 名 | BUI HOANG DANG LONG |
| 学位(専攻分野) | 博士 (工学) |
| 学 位 記 番 号 | 博甲第 1107 号 |
| 学 位 授 与 の 日 付 | 令和 5 年 9 月 25 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 研究科・専 攻 | 工芸科学研究科 バイオベースマテリアル学専攻 |
| 学 位 論 文 題 目 | Studies on production of valuable carboxylic acids in engineered <i>Escherichia coli</i> (遺伝子組換え大腸菌による有用カルボン酸の生産に関する研究) |
| 審 査 委 員 | (主査)教授 麻生 祐司 教授 黒田 浩一 准教授 田中 知成 |

論文内容の要旨

本論文では、遺伝子組換え大腸菌を用いたグルコースからの有用カルボン酸であるグリオキシル酸とグリセリン酸の生産に関する研究について論じた。本論文は次の 4 章からなる。

第 1 章では、本研究の背景について主に大腸菌とそれを利用したカルボン酸生産に関する既知の研究を解説した。簡潔には、大腸菌はゲノム配列が明らかとなっており、また、遺伝子操作技術も確立されていることから、有用物質の生産宿主として広く利用されている代表的な微生物種であること、また、グルコースからグリオキシル酸やグリセリン酸などの有用カルボン酸の生産宿主として遺伝子組換え大腸菌を利用できることなどを説明している。グリオキシル酸とグリセリン酸は工業原料として利用価値が高いことから、本論文の目的化合物としている。

第 2 章では、大腸菌 *Escherichia coli* BW25113 株を遺伝子組換えすることで、グルコースからグリオキシル酸を生産する新規な方法を提案した。グリオキシル酸の生産性を高めるために、グリオキシル酸の生産に関わる代謝経路を強化させた。具体的には、リンゴ酸合成酵素 (*aceB*, *g1cB*)、グリオキシル酸カルボリガーゼ (*gcl*)、グリオキシル酸/ヒドロキシピルビン酸還元酵素 (*ycdW*) 遺伝子を破壊するとともに、クエン酸合成酵素 (*gltA*) とイソクエン酸リアーゼ (*aceA*) 遺伝子を過剰発現させた。10 g/L グルコースを添加した M9 培地を用いたフラスコ培養において、遺伝子破壊株は 0.93 ± 0.17 g/L のグリオキシル酸を生産した。本株で *gltA* と *aceA* を過剰発現させたところ、グリオキシル酸の生産性は 1.15 ± 0.02 g/L に増加した。更に、本株にてコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* 由来のピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 *pyc* を発現させたところ、細胞内オキサロ酢酸の蓄積量が顕著に増加し、グリオキシル酸の生産性は 2.42 ± 0.00 g/L、比生産性は 4.22 ± 0.09 g/g-cell に達した。これは、これまでに報告された大腸菌によるグリオキシル酸生産で最大の生産性および比生産性である。

第 3 章では、大腸菌 BW25113 株を遺伝子組換えすることで、グルコースからグリセリン酸を生産する新規な方法を提案した。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来のグリセロール-3-リン酸デヒドログナーゼ遺伝子 *gpd1* と *gpp2* と、放線菌 *Streptomyces violaceoruber* 由来のアルジトールオキシダーゼ遺伝子 *a1d0* をともに大腸菌に導入し、グルコースからグリセロールを介してグリセリン酸を生産することを試みた。同時に、グリセリン酸キナーゼ遺伝子 *garK* と *glxK* を破壊し、グリセリン酸の自己消費を最小限に抑えた。その結果、*gpd1*, *gpp2*, *a1d0* を発現させた大腸菌は遺伝子非発現株に比べ、グリセリン酸の生産性が約 3 倍増加した。M9 培地を用いて培養したところ、*garK*, *glxK* の破壊により菌体の増殖速度とグリセリン酸の生産性がともに低下したが、0.5

g/L のカザミノ酸および 0.5 g/L の硫酸マンガンを培地に添加したところ、菌体の増殖速度が回復し、その結果、グリセリン酸の生産性も向上した。また、本株にてグリセロールトランスポーター遺伝子 *glpF* を破壊したところ、グリセリン酸の生産性は 0.80 ± 0.00 g/L まで増加した。更に、MR2 培地を用いて培養することで、グリセリン酸の生産性および比生産性が向上することがわかった。

第 4 章では、本論文で得られた成果について総括した。

論文審査の結果の要旨

微生物が生産する代謝物のうち、有用カルボン酸であるグリオキシル酸とグリセリン酸は合成香料、農薬、医薬中間体、ポリマー原料などの工業原料として幅広く利用できる。よって、これらを効率良くグルコースから発酵生産することができれば、これまで石油から化学合成されてきた広範な工業製品のバイオベース化を図ることができ、持続可能な社会の構築の一助となる。そこで本研究では、遺伝子組換えが容易で増殖性に優れる大腸菌を生産宿主として、グルコースからグリオキシル酸とグリセリン酸を直接生産するための技術開発を行っている。これまでに、遺伝子組換え大腸菌を用いてグリオキシル酸とグリセリン酸を発酵生産した類似の研究は幾つか報告されているが、一般に入手しにくいキシロースやグリセリンを基質としており技術の汎用性は乏しい。一方、本研究では入手が容易なグルコースを基質として用い、グリオキシル酸とグリセリン酸を直接生産するための新たな手法を提供しており、これまでの研究とは一線を画す。また、生産宿主の大腸菌はグリオキシル酸とグリセリン酸を分解するため、そのままでは発酵生産性を向上することはできない。一方、本研究では分解代謝に関係すると考えられる複数の遺伝子を同時に破壊して発酵生産性を大きく向上させるとともに、分解に関係する代謝経路を推定することにも成功している。以上のように本研究では、大腸菌の代謝を遺伝子改変により自由にデザインし有用カルボン酸であるグリオキシル酸とグリセリン酸を効率よくグルコースから直接生産するという発酵生産の技術革新に繋がる研究を行っており、学術と実用の両面で評価できる。また、開発した手法はその他の工業原料のバイオベース化にも応用できることから、微生物による新たな物質生産系の可能性を開拓した点でも評価できる。

本論文の基礎となる学術論文は以下の通り、申請者を筆頭著者とする公開済みの論文 2 報である。いずれもレフェリー制度の確立した国際的に著名な学術誌に掲載されており、二重投稿等の研究者倫理に反するような背徳行為のないことを確認した。

1) Bui Hoang Dang Long, Masahiro Nishiyama, Rintaro Sato, Tomonari Tanaka, Hitomi Ohara, Yuji Aso. Production of glyoxylate from glucose in engineered *Escherichia coli*. *Fermentation*, 9(6) 534 (2023)

2) Bui Hoang Dang Long, Kotaro Matsubara, Tomonari Tanaka, Hitomi Ohara, Yuji Aso. Production of glycerate from glucose using engineered *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 135(5) 375–381 (2023)