

1P-152 Multiple-gene-expression of thermophilic enzymes for one-step construction of *in vitro* metabolic pathway

○ Xiaoyu Bei, Ninh Huynh Pham, Kosuke Honda, Kenji Okano, Hisao Ohtake
(Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

In vitro construction of an artificial metabolic pathway has been emerging as a novel approach for the production of a wide range of biomolecules. In this study, genes encoding 9 thermophilic enzymes involved in the non-ATP-forming chimeric glycolytic pathway (1) were assembled in an artificial operon and co-expressed in a single recombinant *E. coli*. The Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis* (OGAB) method (2) was employed to construct the artificial operon. The rank order of the mRNA expression levels of the thermophilic enzymes corresponded to their sequential order in the operon, except that the expression levels of a few genes were unexpectedly high compared with those of other genes. Heat-treatment of the crude extract of multiple-gene-expressing *E. coli* cells at 70°C for 30 min resulted in the thermal inactivation of indigenous enzymes and the one-step preparation of the enzyme cocktail of the nine thermophilic enzymes within one single cell. By coupling this enzyme cocktail with a thermophilic malate/lactate dehydrogenase, one-pot conversion from glucose to lactate could be achieved in an almost stoichiometric manner. Construction of another operon, which encodes 7 enzymes involved in an artificial metabolic pathway for 1-butanol production (3), and its integration to the chimeric glycolytic pathway is now in progress.

(1) Ye X. et al. (2012), *Microbial cell Fact.* 11:120

(2) Tsuge K. et al. (2003), *Nucleic Acids Res.* 31:E113

(3) Krutsakorn B. et al. (2013), *Metabolic Eng.* 20:84-91

Multiple-gene-expression of thermophilic enzymes for one-step construction of *in vitro* metabolic pathway

○ Xiaoyu Bei, Ninh Huynh Pham, Kosuke Honda, Kenji Okano, Hisao Ohtake
(Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words thermophile, *in vitro* metabolic engineering, multiple-gene expression

1P-154 超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株が有する TCA バイパス経路の生化学的解析

○ 矢野 嵩典¹, 吉田 信行², 高木 博史¹
(¹奈良先端大・バイオ, ²静大・工)
tnyoshi@ipc.shizuoka.ac.jp

【目的】 備蓄原油より単離された超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は、炭素源無添加の無機塩寒天培地上で良好な生育を示す。本菌は低栄養生育時に CO₂ 要求性を示すことからユニークな低エネルギー型炭酸固定系を有していると予想している。今回、N9T-4 株の中央炭素代謝に着目し、生化学的解析を行ったので報告する。

【方法・結果】 低栄養条件下で生育させた N9T-4 株の粗酵素液には α-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (KGDH) の活性は検出されなかった。しかしながら、本菌は KGDH の E1 コンポーネント (SucA) のみで、α-ケトグルタル酸 (KG) をコハク酸セミアルデヒド (SSA) に変換する KG デカルボキシラーゼ (KGD) 活性を有していた。本菌由来の *sucA* 遺伝子を大腸菌で発現させ、精製した組換え酵素 (rKGD) にはチアミンピロリン酸依存的に顕著な KGD 活性が確認できた。また、N9T-4 株には SSA をコハク酸に変換する SSA 脱水素酵素 (SSADH) 活性も検出されることから、本菌の TCA 回路においては、SSA を介して KG とコハク酸を繋ぐバイパス経路を含んでいる可能性が示された。現在 *sucA* 遺伝子破壊株の作製を試みており、表現型の確認を予定している。

Biochemical studies of a bypass route of the TCA cycle in an extremely oligotrophic bacterium, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4

○ Takanori Yano¹, Nobuyuki Yoshida², Hiroshi Takagi¹
(¹Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, ²Fac. Eng. Shizuoka Univ.)

Key words alpha-ketoglutarate decarboxylase, oligotroph, *Rhodococcus erythropolis*

1P-153 *In vitro* 代謝工学によるコハク酸生産

○ 嶋田 大起, 橋本 崇大, 岡野 憲司, 本田 孝祐, 大竹 久夫
(阪大院・工・生命先端・生工)
okano@bio.eng.osaka-u.ac.jp

微生物やこれに由来する酵素を触媒とした化学品生産プロセス (バイオプロセス) では、常温常圧に近い温和な条件下で選択的に反応が進行するため、環境負荷の小さいプロセスとして注目を集めている。一方で、複雑な操作と制御が足枷となり、十分に普及しているとは言い難い。バイオプロセスの利便性を向上させるべく、我々のグループでは「*in vitro* 代謝工学」と名付けた新たな生体触媒利用技術を提案し、本法を用いたオンデマンドでの化学品生産に挑戦している。

In vitro 代謝工学は以下の過程から成る。まず代謝経路を組み立てる酵素群を (超) 好熱菌より選択し、大腸菌のような中温菌内で発現させる。得られた組換え菌体を熱処理に供することで宿主由来の酵素が失活し、所望の酵素のみが活性を有した極めて選択性の高い生体触媒を簡便に調製することができる。これらの触媒モジュールを組み合わせることで、任意の化学品生産に特化した代謝経路を *in vitro* で構築することができる。本研究では、*in vitro* 代謝工学の手法を用いることで、サイクル型代謝経路であるグリオキサル酸回路の構築を行った。これによりバイオプラスチックの原料として需要が高まっているコハク酸をアセチル CoA から生産することに成功した。しかしながら、人工グリオキサル酸回路の回転数はわずか 2 回転に留まった。コハク酸を継続的に生産するためには、経路内で生成した NADH を NAD⁺へと再生する必要がある。そこで、本経路を NADH oxidase を用いた NAD⁺再生反応とカップリングさせることで解決を試み、検討を行っているところである。

Succinate production by *in vitro* metabolic engineering

○ Daiki Shimada, Hashimoto Takahiro, Kenji Okano, Kohsuke Honda, Hisao Ohtake
(Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *in vitro* metabolic engineering, thermostable enzyme, NADH oxidase, succinate

1P-155 チオ硫酸リプレッション解除による大腸菌のシステイン発酵生産

○ 河野 祐介, 大津 厳生, 高木 博史
(奈良先端大・バイオ)
iohtsu@bs.naist.jp

【背景・目的】 大腸菌は、硫酸イオン (SO₄²⁻) またはチオ硫酸イオン (S₂O₃²⁻) から、生育に必須の L-システインを合成する二つの硫黄同化経路を有している。従って、チオ硫酸経路上の *cysM* 遺伝子欠損株は、SO₄²⁻ を単一硫黄源として生育できる一方、S₂O₃²⁻ では生育できない。我々は、最近、*cysM* 欠損株が SO₄²⁻ と S₂O₃²⁻ が同時に存在すると生育できない現象 (チオ硫酸リプレッション, TSR) を発見した。しかし、そのメカニズムは不明である。そこで、TSR に関与する遺伝子の同定を試み、高価なチオ硫酸塩だけでなく安価な硫酸塩からのシステイン発酵生産を実現することを目的とした。

【方法・結果】 *cysM* 欠損株に、大腸菌の一遺伝子欠損株ライブラリーである Keio collection を接合させ、*cysM* 以外にもう一つ別の遺伝子が欠損した *cysM/X* 二重欠損株ライブラリーを構築した。このライブラリーから、S₂O₃²⁻ と SO₄²⁻ を硫黄源とした培地で生育可能な株をスクリーニングした結果、*cysM/nudH* 二重欠損株を取得した。従って、NudH (mRNA 分解に関与する酵素) が SO₄²⁻ 同化の抑制に関与していることが示唆された。そこで、システイン生産大腸菌株で *nudH* 遺伝子を破壊したところ、SO₄²⁻ を硫黄源としてシステイン生産量が約 2 倍に増加した。

L-Cysteine fermentative production using *Escherichia coli* engineered for sulfate assimilation

○ Yusuke Kawano, Iwao Ohtsu, Hiroshi Takagi
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words *Escherichia coli*, L-cysteine fermentation, sulfate assimilation