



Title	Development of Escherichia coli Platform for Tyrosine-derivative Production Using Aromatic Amino Acid Hydroxylases [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Sheng, Ning
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第15876号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92137
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SHEN_NING_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（工学） 氏名 申 寧

主査教授 松本 謙一郎
審査担当者 副査教授 渡慶次 学
副査教授 大利 徹
副査准教授 南 篤志
副査助教 佐藤 康治

学位論文題目

Development of *Escherichia coli* platform for tyrosine-derivative production using aromatic amino acid hydroxylases

(芳香族アミノ酸水酸化酵素を用いたチロシン関連化合物生産のための大腸菌の構築)

生物はタンパク質アミノ酸であるチロシン (Tyr) から、工業的に利用される重要な芳香族化合物を生合成する。これら化合物は生産者である動植物等から抽出することで得られるが、それらの成長は遅く、化合物の含有量も低い。この課題解決のため、石油を原料に化学合成されてきたが、環境への負荷や原料の枯渇が懸念されている。このような背景から、環境調和型で持続可能な製造プロセスとして微生物を用いるバイオプロセスが注目されている。

Tyr 誘導体を生産するバイオプロセスの開発のため、著者はフェニルアラニン (Phe) ヒドロキシラーゼ (PheH) を用いる簡便な Tyr 高生産大腸菌を構築した。PheH は O₂ と補酵素テトラヒドロモナプテリン (MH4) を用い Phe を Tyr に変換する。本反応の進行に伴って、MH4 はジヒドロモナプテリンに酸化される。効率的な Tyr 生産には MH4 再生系が必要であり、プテリン-4 α -カルビノラミンデヒドラターゼ (PCD) とジヒドロプテリジンレダクターゼ (DHPR) を利用した。

はじめに、PheH、PCD および DHPR をコードする遺伝子をプラスミドで発現する大腸菌を構築した。その Tyr 生産量は、30.3 mM (5.00 g/L) Phe を含む培地を用いて 25.5 mM (4.63 g/L) であった。続いて、本株を工業生産されている化合物チロソールの生産に応用した。Tyr をチロソールへ変換するため、Tyr 脱炭酸酵素 (TDC) とチラミン酸化酵素 (TYO) をコードする 2 つの遺伝子をプラスミドで更に導入した結果、チロソールを 11.5 mM (1.58 g/L) 生産することを確認した。

染色体工学は、プラスミドを用いる方法と比較して、培地に抗生物質を添加することなく導入遺伝子の遺伝的安定性を高めることができるだけでなく、プラスミド維持に伴う代謝負荷も軽減できる利点がある。そこで、PheH 遺伝子を *tac* プロモーターで、PCD-DHPR 遺伝子オペロンを *lac* プロモーターで発現制御した DNA 断片を染色体に組込んだ大腸菌株を構築した。しかし、Tyr 生産量は上述のプラスミドを用いた系に比べ 0.25 mM (0.05 g/L) と非常に低かった。その理由として、遺伝子発現量の低さが考えられたため、より強力な *T7* プロモーターの利用と代謝経路中の律速ステップの解除によって、30.3 mM (5.00 g/L) Phe を含む培地を用いて Tyr を 28.6 mM (5.19g/L) 生産可能な系の構築に成功した。次に、本株をチロソール生産へ応用した。スクリーニングにより選抜された高活性 TDC と TYO をコードする遺伝子を各々 *T7* プロモーター制御下で染色体に組込むことによりチロソール生産株を構築した。チロソール生産試験の結果、予想に反して、生産量は 3.8 mM (0.53 g/L) と非常に低かった。この原因として、TYO の反応生成物 4-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドに由来するメラニン様色素の副生が示唆された。そこで、4-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドのチロソールへの還元を触媒する中鎖デヒドロゲナーゼ/レダクターゼをコードする遺伝子を導入し、さらに培地組成を改変することにより、色素形成を抑制しつつ、チロソール生産量を 17.5 mM (2.42 g/L) まで向上させることに成功した。

これを要するに、著者はプラスミドおよび染色体工学による目的遺伝子の高発現により、試験管培養で Phe から Tyr、および Tyr 誘導体を数 g/L レベルで生産する大腸菌プラットフォームを開発した。これらの結果は、応用微生物学に貢献するところ大なるものがある。

よって、著者は北海道大学 博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。