

Novel pathway construction and optimization of *Corynebacterium glutamicum* for next generation biofuel production²

Yusuke Sasaki

Graduate School of Advanced Integrated Studies in Human Survivability

Kyoto University

Abstract

Many microbes used for the rapid discovery and development of metabolic pathways have sensitivities to final products and process reagents. Isopentenol (3-methyl-3-buten-1-ol or isoprenol), a biogasoline candidate, has an established heterologous gene pathway but is toxic to several microbial hosts. Reagents used in the pretreatment of plant biomass, such as ionic liquids, also inhibit growth of many host strains. We explored the use of *Corynebacterium glutamicum* as an alternative host to address these constraints. We found *C. glutamicum* ATCC 13032 to be tolerant to both the final product, isopentenol, as well to three classes of ionic liquids. A heterologous mevalonate-based isopentenol pathway was engineered in *C. glutamicum*. Targeted proteomics for the heterologous pathway proteins indicated that the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase protein, HmgR, is a potential rate-limiting enzyme in this synthetic pathway. Isopentenol titers were improved from undetectable to 1.25 g/L .

²This study is conducted as a part of the Special Research Project II and III in Graduate School of Advanced Integrated Studies in Human Survivability, Kyoto University and a part of the DOE Joint BioEnergy Institute (<http://www.jbei.org>) supported by the U. S. Department of Energy, Office of Science, through contract DE-AC02-05CH11231 between Lawrence Berkeley National Laboratory and the U. S. Department of Energy. The author is grateful for helpful comments and suggestions by Dr. Aindrila Mukhopadhyay, Dr. Thomas Eng, Dr. Christopher J. Petzold (Joint BioEnergy Institute/Lawrence Berkeley National Laboratory)

次世代バイオ燃料創製に向けた *Corynebacterium glutamicum* における
新奇代謝経路の構築と最適化¹

佐々木勇輔（京都大学大学院総合生存学館）

要 旨

これまでに、多様な微生物が医薬品やバイオ燃料創製のために育種されてきた。生物由来のガソリン候補である Isopentenol の生産に向けた異種代謝経路はこれまでに構築されてきた。しかしながら、Isopentenol の宿主微生物に対する毒性が問題であった。加えて、植物バイオマスの前処理に利用されるイオン液体は、また宿主微生物に対する生育阻害作用を示すことがわかっていた。我々は、*Corynebacterium glutamicum* に焦点を当て、従来の制限の解決に取り組んだ。イオン液体に対する耐性を評価した結果、*C. glutamicum* は Isopentenol および代表的な 3 種類のイオン液体に対する高い耐性能を従来の宿主である大腸菌と比較して示した。Isopentenol 生産代謝経路（改変メバロン酸経路）を *C. glutamicum* に導入した。さらに、プロテオーム解析によって NADH 依存性の 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase が律速段階の酵素であることを解明した。そこで、NADPH 依存性の 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (*Silicibacter pomeroyi* 由来) に置換した。その結果、1.25 g/L の生産量を達成した。

¹本稿は、京都大学大学院総合生存学館における特殊研究 II, III の成果の一部である。本稿の原案に対して、Dr. Aindrila Mukhopadhyay, Dr. Thomas Eng, Christopher J. Petzold (Joint BioEnergy Institute/Lawrence Berkeley National Laboratory) から多くの有益なコメントを頂いた。ここに記して、感謝の意を表したい。