

## 論文内容の要旨

申請者氏名 Jirasin Koonthongkaew

Branched-chain higher alcohols (BCHAs) or fusel alcohols, including isobutanol, isoamyl alcohol, and active amyl alcohol, are useful compounds in several industries. They have been an interesting next-generation biofuel to replace ethanol and identified as an important flavor component in many beverages. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* can naturally synthesize BCHAs from the metabolic pathway of branched-chain amino acids [BCAAs: valine (Val), leucine (Leu), and isoleucine (Ile)] by sharing the same key intermediates between biosynthesis and degradation of BCAAs, branched-chain  $\alpha$ -keto acid (BCKAs):  $\alpha$ -ketoisovalerate (KIV) for Val,  $\alpha$ -ketoisocaproate (KIC) for Leu, and  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvalerate (KMV), respectively. BCKAs are further converted by  $\alpha$ -keto acid decarboxylases and alcohol dehydrogenases into BCHAs: isobutanol from Val, isoamyl alcohol from Leu, and active amyl alcohol from Ile, respectively. The BCAAs metabolic pathway is tightly regulated, such as feedback inhibition through metabolic enzymes or transcriptional regulation and nitrogen catabolite repression. The key and rate-limiting enzymes for BCHA production via the Ehrlich pathway of BCAAs are branched-chain amino acid aminotransferases (BCATs). BCATs catalyze a bi-directional transamination reaction between BCKAs and BCAAs. In *S. cerevisiae*, there are two BCATs isoforms, the mitochondrial Bat1 and the cytosolic Bat2, which are encoded by the genes *BAT1* and *BAT2*. Although many studies have shown the effects of deletion or overexpression of *BAT1* and *BAT2* on BCHA production, there have been no reports on the enhancement of BCHA production by functional variants of BCATs. In this study, to improve BCHA productivity, the applicant designed variants of Bat1 and Bat2 that alter the enzymatic activity or the substrate specificity by *in silico* computational analysis: the Gly333Ser and Gly333Trp Bat1 and corresponding the Gly316Ser and Gly316Trp Bat2 variants, respectively. When BCAT variants were expressed in *S. cerevisiae* cells, most of them caused a growth defect in minimal medium. Interestingly, the Gly333Trp Bat1 and Gly316Ser Bat2 variants achieved 18.7-fold and 17.4-fold increases in isobutanol compared with the wild-type enzyme, respectively. The enzyme assay revealed that the catalytic activities of all four BCAT variants were lower than that of the wild-type enzyme due to the additional intramolecular interaction and a bulkier side-chain from the substituted amino acids (Ser and Trp) from the original amino acid (Gly). These results indicate that decreased BCAT activity enhanced BCHA production by reducing BCAA biosynthesis, which occurs via a pathway that directly competes with BCHA production. Such an approach provides new insight into the functions of BCATs and will be useful in the future construction of enzymes optimized for high-level production of BCHAs.

- やむを得ない事由[ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Jirasin Koonthongkaew

イソブタノール、イソアミルアルコール、活性アミルアルコールなどの分岐鎖高級アルコール (BCHA) は、次世代バイオ燃料や香気成分として有用な化合物である。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の代謝経路を経由して BCHA を合成するが、BCAA アミノトランスアミナーゼ (BCAT) は、BCAA の Ehrlich 経路を介して BCHA 生成の鍵となる酵素である。BCAT は分岐鎖  $\alpha$ -ケト酸 (BCKA) と BCAA との双方向のアミノ転移反応を触媒しており、酵母ではミトコンドリア型 Bat1 とサイトゾル型 Bat2 のアイソフォームが存在している。申請者は、BCHA の生産性向上を目的に、Bat1 および Bat2 の変異体を *in silico* で設計し、以下のような新たな知見を得た。

- 1) ヒト由来 BCAT の結晶構造を鋳型として、SWISS-MODEL から Bat2 の構造モデルを構築し、Bat2 に結合するリガンドの 5Å 以内に位置する残基を抽出後、活性に直接関与しないと考えられる 12 残基を選抜した。12 残基について、CUPSAT と mCSM-lig を用いて Bat2 の安定性および基質結合親和性を高めると予想されるアミノ酸置換を行い、2 つの候補を得た (Bat2: Gly316Ser, Gly316Trp, Bat1: Gly333Ser, Gly333Trp)。
- 2) 各変異体を酵母の細胞内で発現させると、そのほとんどが野生型酵素に比べて最少培地で生育不良を引き起こし、Bat1-Gly316Trp の発現株は生育できなかった。興味深いことに、各変異体 (Bat1-Gly333Ser, Bat1-Gly333Trp, Bat2-Gly316Ser) の発現株では、野生型酵素と比較して BCHA の生産量が大幅に向上し、特に Bat1-Gly333Trp, Bat2-Gly316Ser ではイソブタノールが 17-18 倍に増加したことを見出した。一方、各変異体の発現株では、野生型酵素と比較して BCAA 含量が有意に減少していた。
- 3) 組換え酵素を用いてカイネティクス解析を行った結果、各変異体は野生型酵素よりも両基質 (BCAA, BCKA) に対する活性が著しく低下しており、元の Gly から側鎖の大きい Ser, Trp への置換により分子内の相互作用が増えたためだと考えられた。また、各変異体の発現株では、活性が低下したことで、BCHA 生産と直接競合する BCAA 合成経路が弱化した結果、BCHA の生産が促進されたことが強く示唆された。本研究の成果は、BCAT の機能に関して新たな知見を提供するだけでなく、BCHA の生産性向上に最適な酵素の設計、構築に資することができる。また、Bat1 および Bat2 をコードする遺伝子の欠失や過剰発現が BCHA 生産に及ぼす影響に関しては研究されているが、BCAT の機能低下型変異体による BCHA の生産性向上についてはこれまで報告がなく、申請者が見出した知見は基礎・応用の両面で大きな意義がある。

以上のように、本論文は BCAT の機能改変によって、BCHA の生産性を大幅に増加させたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由 [ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ] により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】