



Enhancement of NADPH levels in *Bacillus subtilis* and its applications

WU, YUZHENG

(Degree)

博士（科学技術イノベーション）

(Date of Degree)

2025-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9249号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100496530>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(別紙様式 3)

論文内容の要旨

氏 名 WU YUZHENG

専 攻 科学技術イノベーション専攻

論文題目（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）
Enhancement of NADPH levels in *Bacillus subtilis* and its applications
枯草菌における NADPH レベルの増強とその応用

指導教員 Yoshida Ken-ichi

（注）2, 000 字～4, 000 字でまとめること。

NADPH is an indispensable electron donor in all living organisms, including eukaryotes, bacteria, and archaea; it has a dual role, being oxidized by NADPH oxidase to produce reactive oxygen species, which maintain the organism's antioxidant defense system. More importantly, NADPH provides the essential reducing power in several anabolic enzymatic reactions involved in the biosynthesis of various cellular components such as DNA and lipids. Furthermore, many more complex secondary metabolites depend on processes involving NADPH-dependent enzymes. Thus, they are very important auxiliaries in the critical biological processes of NADPH. Traditionally, some pathways of central carbon metabolism, the oxidative pentose phosphate pathway, the Entner-Doudoroff pathway, and the isocitrate dehydrogenase step of the tricarboxylic acid cycle, are regarded as the principal sources of NADPH. In addition, the importance of other NADPH-generating enzymes, such as transhydrogenase, glucose dehydrogenase, and non-phosphorylated glyceraldehyde triphosphate dehydrogenase, are involved. In particular, in many bacterial species, including *Escherichia coli* (*E. coli*), NAD(P)^+ transhydrogenase uses NADH to reduce NADP^+ to NADPH.

In *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), however, the conventional gene encoding this enzyme has not been identified in the genome. It is also unknown what enzymatic reaction plays the principal role in supplying NADPH, nor is it known how it is regulated. I conceived this study to elucidate the mechanism of NADPH supply and its regulation in *B. subtilis* and to use this information for bioproduction. As the global chemical industry seeks to reduce its dependence on fossil fuels and minimize its environmental impact, the demand for bioproduction as a sustainable chemical production process has never been greater. We felt that augmenting NADPH supply to promote bioproduction using *B. subtilis* would be a very effective strategy (Chapter 1).

To artificially promote NADPH supply in *B. subtilis*, I constitutively expressed *gdh*, a gene encoding a glucose dehydrogenase that oxidizes NADP^+ to give NADPH. This expression increased

intracellular NADPH levels. By the way, we can postulate that the luminescence of bacterial luciferase may be enhanced in response as the concentration of FMNH₂ elevates, and the concentration of FMNH₂ is assumed to increase in response to the NADPH level. Indeed, when the bacterial luciferase gene cluster *luxABCDE* from *Photorhabdus luminescens* was expressed simultaneously with *gdh*, the luminescence of the bacterial luciferase appeared to be enhanced. Thus, I have developed a methodology to utilize the luminescence of bacterial luciferases as a non-destructive reporter of intracellular NADPH levels (Chapter 2).

Next, based on the luminescence of the bacterial luciferase, I screened a library of mutants derived from random mutagenesis to select several mutants with markedly enhanced luminescence. The elevated NADPH levels in them were revealed. Further analysis of these mutants should provide insight into what enzymatic reactions are involved in the elevated NADPH levels in *B. subtilis* and how these reactions are regulated. Furthermore, the elevated NADPH levels led to the development of bioproduction of value-added compounds (Chapter 3).

Therefore, the next goal is to set up the bioproduction of any useful compound. Among the various chemicals produced by *B. subtilis*, 2,3-butanediol (2,3-BD) stands out as a versatile biobased compound. 2,3-BD is an attractive target for biotechnological production due to its diverse uses in plastics, biofuels, and personal care products. In *B. subtilis*, pyruvate produced from glucose by glycolysis is converted into acetoin by a two-step reaction using AlsS and AlsD, which can then be reduced to 2,3-BD by 2,3-butanediol dehydrogenase (BdhA). However, this reduction of acetoin is disadvantageous because most NADH is used for ATP production through respiration in *B. subtilis*. Therefore, if we could switch the NADH-dependency of BdhA to NADPH, 2,3-BD production should be efficient as no competition for NADH with respiration occurs. Overproduction of acetoin in

B. subtilis was enhanced by constitutive and strong expression of AlsS and AlsD and by preventing the waste of carbon sources by other pathways (Chapter 4). Thus, the conversion of acetoin into 2,3-BD is the final bottleneck.

For modification of the cofactor-dependency of BdhA, rational site-directed mutagenesis, which is designed from amino acid sequence comparison of BdhA with an NADPH-dependent enzyme paralogous to BdhA, and random mutagenesis using a strategy of screening using an *E. coli* mutant host that requires a supply of NADPH (Chapter 5). Integrating all the above, I can draw a story of efficient 2,3-BD production achieved by the NADPH-dependent mutant BdhA in a mutant strain with enhanced NADPH levels and acetoin overproduction.

I aim to make the broader implications of these scientific innovations through a business strategy that envisions the realization of 2,3-BD bioproduction. By identifying intellectual property opportunities and proposing viable commercial pathways, I aim to bridge the gap between scientific discovery and industrial application and provide a roadmap for the sustainable production of 2,3-BD (Chapter 6). Building on the scientific and academic contributions of advancing our understanding of the enhancement and regulation of NADPH levels in *B. subtilis*, my study also encompasses contributions that further occupy the development of environmentally friendly 2,3-BD bioproduction process and its social implementation, with significant economic and ecological benefits.

氏名	WU YUZHENG			
論文 題目	Enhancement of NADPH levels in <i>Bacillus subtilis</i> and its applications (枯草菌における NADPH レベルの増強とその応用)			
審査委員	区 分	職 名	氏 名	署 名
	主 査	教授	吉田 健一	吉田 健一
	副 査	特命教授	田口 精一	田口 精一
	副 査	教授	蔭山 広明	蔭山 広明
	副 査	准教授	石川 周	石川 周

要 旨

概要:

WU YUZHENG の博士論文の内容は以下の通りに要約される。

先ず第1章は、研究の背景を簡潔にまとめた序論として位置づけられる。その内容は以下の通りである。NADPH は、真核生物、細菌、古細菌などのあらゆる生物において、重要な電子供与体としての役割を果たしている。NADPH には二重の役割があり、NADPH オキシダーゼによって酸化されて活性酸素種 (ROS) を生成し、生物の抗酸化防御システムを維持する一方、さらに重要なことは DNA や脂質のような必須細胞成分の生合成に関わる数多くの酵素反応に還元力を与えることである。さらに複雑な二次代謝産物も NADPH 依存性酵素が関わる過程を経て合成されるものが多い。このように、NADPH は生物学的行程において非常に重要な補助因子である。一般に NADPH は、酸化的ペントースリン酸経路、Entner-Doudoroff 経路、TCA サイクルのイソクエン酸デヒドロゲナーゼ反応等により供給されると認識されてきた。加えて、NAD(P)⁺トランスヒドロゲナーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、非リン酸化型グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼなど、他の NADPH 生成酵素の重要性も示されている。特に、大腸菌をはじめとする多くの細菌種では、NAD(P)⁺トランスヒドロゲナーゼが NADH を利用して NADP⁺を NADPH に還元することが重要視されている。しかし枯草菌では、この酵素をコードする典型的遺伝子がゲノム上に同定されない。さらには、NADPH の供給を担う酵素反応が特定されておらず、またそれがどのように調節されているかも定かではない。そこで、枯草菌における NADPH 供給のメカニズムとその調節機構を明らかにして、さらにはそれをバイオプロダクションに役立てる本研究を想起した。世界の化学産業が化石燃料への依存を減らし、環境への影響を最小限に抑えようとする中、持続可能な化学品生産のプロセスとしてバイオプロダクションへの要求はかつてないほど高まっている。枯草菌を用いてバイオプロダクションを推進するために NADPH 供給を増強することは非常に有効な戦略であると考えた。

次いで第2章では、独自に開発した非破壊的な NADPH レベルの検出系について以下のように解説している。枯草菌において人工的に NADPH 供給を促進するために、NADP⁺を還元して NADPH を与える胞子形成特異的なグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である *gdh* を構成的に発現させ、この発現によって細胞内の NADPH レベルが上昇することが確かめられた。ところで、バクテリア型ルシフェラーゼの発光は FMNH₂ の濃度に依存して増強すると考えられており、また枯草菌においては FMNH₂ の濃度が NADPH レベルに呼応して増加するという仮説を立てた。そこで、*Photorhabdus luminescens* に由来するバクテリア型ルシフェラーゼ遺伝子群をコードする *luxABCDE* を *gdh* と同時に枯草菌において発現させたところ、バクテリア型ルシフェラーゼの発光が、液体培養および寒天プレート上において増強されることが示された。これによって、バクテリア型ルシフェラーゼの発光を細胞内 NADPH レベルの

氏名	WU YUZHENG
<p>非破壊的なレポーターとして活用する方法論を構築することができた。</p> <p>第3章では上記をさらに展開し、バクテリア型ルシフェラーゼの発光に基づいて、EMSによるランダムに変異を導入した変異株ライブラリーから、発光が顕著に増強した変異株を寒天プレート上のコロニーレベルで複数選抜し、それらにおいては実際に NADPH レベルが高められていることを確認した。今後は当該方法論によって得られた変異株の解析を進め、枯草菌においてどのような酵素反応や代謝経路が NADPH レベルの増強に寄与しており、またそれらがどのように調節されているかに関する理解が進むはずである。さらには、この増強された NADPH を利用して有用な化合物のバイオプロダクションの開発を進めることが可能となる。</p> <p>ここで NADPH レベルの増強が実際的となり、これを活かして如何なる有用化合物のバイオプロダクションを設定するかが次の目標となる。枯草菌によって生産される様々な化学物質の中でも、2,3-ブタンジオール (2,3-BD) は汎用性の高いバイオベース化合物として際立っている。2,3-BD は、プラスチック、バイオ燃料、パーソナルケア製品など多様な用途があり、バイオテクノロジーによる生産にとって魅力的なターゲットである。グルコースから解糖等を経て生産されたピルビン酸は、AlsS と AlsD による2段階の反応を経てアセトインに還元され、アセトインは2,3-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ (BdhA) によって2,3-BD に還元される。しかし、枯草菌では BdhA が NADH に依存しており、NADH の多くが呼吸による ATP 産生に優先的に使われるため不利となる可能性が高い。従って、BdhA の補酵素依存特性を NADH から NADPH へ変更することができれば、呼吸との競合を避けて効率的な2,3-BD の生産が可能となるはずである。</p> <p>そこで、第4章では枯草菌によるアセトインの効率的生産を目指し、AlsS と AlsD を高発現させ、アセトインを分解浪費する <i>aco</i> 遺伝子を不活性化することで達成した経緯を述べている。さらに第5章では、アセトインを2,3-BD へ変換する BdhA の補酵素依存特性の変更について、BdhA とパラログの関係にある NADPH 依存性の YhfP 酵素とのアミノ酸配列アラインメントより推定した部位特異的変異導入により論理的に変異体を得る戦略を述べて、その進捗状況を報告している。さらに、ランダム変異を導入したライブラリーを作成して NADPH 供給を要求する大腸菌ホストを用いてスクリーニングするもう一つの戦略についても準備があると述べている。最終的には、NADPH レベルを増強する菌株育種 (第3章)、アセトインの効率生産系 (第4章)、そして上記のいずれかによって作成される変異 BdhA を統合することで、効率的2,3-BD のバイオプロダクションが達成されるストーリーを描いている。</p> <p>第6章では、2,3-BD のバイオプロダクションが実現したことを想定してビジネス戦略を構築し、それが及ぼす科学的イノベーションの影響についても検討を加えている。先ず、NADPH レベルの増強方法とその結果得られる変異株について、そして BdhA の補酵素特性を変更する技術あるいは当該変異酵素そのものについて、それぞれを知的財産とし、これを基にバイオプロセス設計コンサルタント企業を立ち上げる。そして、そのサービスに対する対価と投資を受け入れて資金調達を進め、2,3-BD を自社生産する持続可能な化学品製造企業の設立に至るロードマップを提案している。以上は、枯草菌における NADPH レベルの増強とその調節の理解を進めるという学術的な貢献を踏まえて、環境に優しい2,3-BD バイオ生産プロセスを社会実装する貢献を果たし、結果的に経済的にも環境的にも大きな利益をもたらす見込みを述べている。</p> <p>そして最後には、第7章および第8章それぞれにて学位論文全体を見渡した考察と取り纏めを加えている。</p> <p>本研究は、枯草菌における NADPH 供給のメカニズムについて、その調節機構の理解に迫ための基礎を研究し、また新たな NADPH レベルの非破壊的測定技術を開発したものであり、NADPH の還元力を用いて効率的な有用化合物のバイオプロダクションの方法論を導く可能性に関して重要な知見を得たものとして価値ある集積である。提出された論文は科学技術イノベーション研究科学学位論文評価基準を満たしており、学位申請者の WU YUZHENG は、博士 (科学技術イノベーション) の学位を得る資格があると認める。</p>	