

学 位 論 文 題 名

コリネ型グルタミン酸生産菌の
エネルギー代謝変異に関する研究

学位論文内容の要旨

C. glutamicum をはじめとする微生物を利用したアミノ酸などの有用物質の発酵生産は我が国で始められた日本が誇る産業の一つである。近年までに発酵の改良のため、突然変異の誘導から遺伝子工学的手法の応用まで様々な菌株育種が行われてきた。これら育種のターゲットとされたのは主に目的物質固有の生合成経路であった。さらなる発酵の効率化や新規な発酵系の構築のためにはこれまでとは異なる点をターゲットにする必要がある。そこで当研究室では糖質を原料とした発酵の出発経路である解糖系をはじめとする生命の根本に関わる中枢代謝系、特にエネルギー代謝系に注目した研究を行ってきた。そもそも解糖系も基質レベルのリン酸化によって ATP を生合成するエネルギー代謝系である。そのキーエンザイムであるピルビン酸キナーゼは AMP によってアロステリックに制御されていることが知られている。従って、ATP の主要な生合成系である F_1F_0 -ATPase へのアプローチによって、解糖系をはじめとする中枢代謝に影響を与えられる可能性がある。大腸菌によるピルビン酸生産をモデル系とした一連の研究により、 F_1F_0 -ATPase の欠損変異が糖代謝や呼吸の活性化を引き起こし、ピルビン酸の生産性向上に結びつくことを明らかにした。さらに、*C. glutamicum* における F_1F_0 -ATPase 活性低下株を用いた研究ではグルタミン酸生産性は失われたが、大腸菌同様糖代謝と呼吸の活性化を認め、 F_1F_0 -ATPase の変異が代謝に大きな影響を与えることを示した。

このような背景に基づき、本論文ではエネルギー代謝変異が *C. glutamicum* におよぼす影響についてさらなる解析を行うために、 F_1F_0 -ATPase 遺伝子の取得、解析と、遺伝子工学的変異株の作出を行った。

F_1F_0 -ATPase 遺伝子のクローニングとシーケンシングの結果、*C. glutamicum* の F_1F_0 -ATPase の遺伝子は一般的なバクテリア様のオペロン構造、*atpI*, *B* (a), *E* (c), *F* (b), *H* (δ), *A* (α), *G* (γ), *D* (β), *C* (ε)の順に列んだ構造（カッコ内は各遺伝子がコードするサブユニットを示す）をとり、*atpI* の最初から *atpC* の終わりまでのサイズが 7646 bp であった。各サブユニットのアミノ酸配列を種の近い菌、そうでない菌と比較した結果、サブユニット間では c, α, βサブユニットが非常に高い相同性を示し、γサブユニットが比較的高い相同性を示した。またこの4つのサブユニットは機能的に保存されていると思われる領域を多く内存させていた。得られたシーケンスデータを元に過去に得られた *C. glutamicum* の F_1F_0 -ATPase 活性低下株である F172-8 株の変異点を解析したところ、一カ所、γサブユニットの273番目のアミノ酸であるセリンがプロリンに変化していた。また、復帰変異株 R2-1ではこの変異点がさらにロイシンへと変化していた。 F_1F_0 -ATPase の各サ

ブユニットの構成において c サブユニットの割合が非常に高いことから、c サブユニットのみを生成するような転写産物の存在が予想されたが、ノーザンハイブリダイゼーションの結果そのような転写産物はなく、*atp* オペロンの転写産物は全長をカバーする約 8 kb の一種類であることが明らかとなった。また、RT-PCR とプライマーエクステンションにより本オペロンの転写開始点の解明を試みたが正確な位置を決定するには至らなかった。

クローニングした DNA 断片を用いて予想されるプロモーターからターミネーターまでを十分に含む F_1F_o -ATPase 全オペロン遺伝子を保持するプラスミドとして pCSATP を作出し、これを用いて *C. glutamicum* の形質転換を行った。この形質転換体の ATPase 活性は野性株に比べ、最大で約 2.7 倍まで上昇しており、ノーザンハイブリダイゼーションの結果、転写産物量も明らかに増加していた。

得られた形質転換株 (F_1F_o -ATPase 発現上昇株) のグルタミン酸発酵を行い、培養中の攪拌数、培地中のビオチン濃度の影響について詳細に検討した。形質転換株は野性株に比べ、生育速度の減少、最大生育量の増加、酸素要求性、グルタミン酸生産期における菌体あたりの糖消費活性や酸素消費速度の増大などの性質を示し、グルタミン酸生産期において野性株よりも代謝能力が高いことが示唆された。さらに、溶存酸素濃度の低い条件では野性株よりもグルタミン酸生産能が低く、逆に、十分な溶存酸素濃度のある条件では野性株よりわずかにグルタミン酸生産能が高くなる傾向にあることも明らかとなった。攪拌数を 1200 rpm まで上昇させた場合、野性株は生育阻害を受けたが、形質転換株はそれほど生育の低下を示さなかった。この生育阻害は高速の攪拌による物理的ダメージの為とも考えられるが、形質転換株において阻害の程度が小さいことから、過剰な酸素の影響と考えることもできる。このことから、形質転換株が酸素利用能力が高く酸素過剰条件により適していることが示唆される。ビオチン濃度の検討を行った結果、従来の知見通り、よりビオチン量を制限した方がグルタミン酸発酵には適していることがわかった。

さらに形質転換株のより詳細なエネルギー代謝特性を調べるため、膜電位、細胞内 pH、細胞内 ATP 量の測定を行った。膜電位測定の結果、膜電位、 ΔpH 双方の指標がともに野性株に比べて大きく、形質転換株のプロトン駆動力が野性株よりも高く形成されていることが示唆された。さらに細胞内 pH の測定の結果から、形質転換株の ΔpH が実際に野性株よりも大きいことが明らかとなった。これらの結果から、確かに形質転換株は野性株に比べて大きなプロトン駆動力を形成していることが明らかとなった。

細胞内 ATP 量の測定の結果、野性株、形質転換株ともに対数増殖初期に ATP 含量が最大となり、定常期に向かって低下する傾向の経時変化を示したが、予想に反し培養初期と培養後期において形質転換株の ATP レベルが野性株よりも低下していることが判明した。培養後期についてはグルコースも少なくなり、生合成反応が低下し、ATP レベルを維持する必要性も低下していると考えられ、このような状況で F_1F_o -ATPase が過剰発現していると、 F_1F_o -ATPase は細胞内に残っている ATP を分解し尽くし、これと共役してプロトンを細胞外により多く排出してしまっている可能性が考えられる。測定された膜電位と細胞内 pH は定常状態を反映していると考えられる。このことからプロトン駆動力上昇の説明が付く。しかしながらこのメカニズムについてはより詳細な解析が必要である。

以上のようにエネルギー代謝変異による中枢代謝系への影響は非常に大きく興味深い。さらなる研究によって有用物質の発酵生産性向上に貢献できる結果が得られるものと期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	横田	篤
副査	教授	富田	房男
副査	教授	松井	博和
副査	助教授	浅野	行蔵

学位論文題名

コリネ型グルタミン酸生産菌の エネルギー代謝変異に関する研究

本論文は8章からなり、図28、表9、引用文献27を含む総項数62の和文論文である。別に参考論文2編が付されている。

*Corynebacterium glutamicum*をはじめとする微生物を利用したアミノ酸などの有用物質の発酵生産において、近年までに発酵の改良のため、突然変異の誘導から遺伝子工学的手法の応用まで様々な菌株育種が行われてきた。これら育種のターゲットとされたのは主に目的物質固有の生合成経路であった。さらなる発酵の効率化や新規な発酵系の構築のためにはこれまでとは異なる点をターゲットにする必要がある。そこで当研究室では糖質を原料とした発酵の出発経路である解糖系をはじめとする中枢代謝系、特にエネルギー代謝系に注目し、 F_1F_o -ATPase（以後単にATPaseとする）をターゲットとした研究が行われてきた。解糖系のキーエンザイムがAMPやADPによってアロステリックに活性化することから、ATPレベルを低下させ解糖系の活性化を図るために、大腸菌のピルビン酸生産株や*C. glutamicum*のグルタミン酸生産株においてATPaseの欠損変異株が取得され、実際に糖代謝活性の上昇が確認された。さらにこれらの変異株において、呼吸活性の上昇など連鎖的なエネルギー代謝の変化が観察され、ATPaseの変異がエネルギー代謝、ひいては中枢代謝系に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

本研究では*C. glutamicum*のグルタミン酸生産菌において、ATPaseの変異が代謝におよぼす影響をより詳細に解析するため、ATPase遺伝子の取得、解析と、遺伝子工学的な変異株の作出、おもに活性上昇株の作出と解析を行った。

1. ATPase遺伝子の取得と解析

ATPase遺伝子のクローニングとシーケンシングの結果、*C. glutamicum*のATPaseの遺伝子は一般的なバクテリア様のオペロン構造、*atpI*, *B* (a), *E* (c), *F* (b), *H* (δ), *A* (α), *G*

(γ), D (β), C (ϵ)の順に列んだ構造(カッコ内はコードされるサブユニット)をとり, *atpI* から*atpC*までのサイズが7646 bpであった. 各サブユニットのアミノ酸配列の相同性を比較した結果, 近縁な菌との相同性は全てのサブユニットにおいて近縁でない菌よりも高く, また, サブユニット間では c , α , β サブユニットが非常に高い相同性を示し, γ サブユニットが比較的高い相同性を示した.

ATPaseの各サブユニットの構成において c サブユニットの割合が非常に高いことから, c サブユニットのみを生成するような転写産物の存在が予想されたが, ノーザンハイブリダイゼーションの結果そのような転写産物は検出されなかった.

2. ATPase活性上昇株(形質転換株)の作出とグルタミン酸発酵分析

クローニングしたDNA断片を用いて予想されるプロモーターからターミネーターまでを十分に含むATPase全オペロン遺伝子を保持するプラスミドとしてpCSATPを作出し, これを用いて*C. glutamicum*の形質転換を行った. この形質転換体のATPase活性は野性株に比べ, 約2.7倍に上昇していた.

得られた形質転換株のグルタミン酸発酵を行い, 培養中の攪拌数, 培地中のビオチン濃度の影響について検討した. 形質転換株は野性株に比べ, 生育速度の減少, 最大生育量の増加, 酸素要求性, グルタミン酸生産期における菌体あたりの糖消費活性や酸素消費速度の増大などの性質を示し, グルタミン酸生産期において野性株よりも代謝能力が高いことが示唆された. さらに, 溶存酸素濃度の低い条件では野性株よりもグルタミン酸生産能が低い, 逆に, 十分な溶存酸素濃度のある条件では野性株よりわずかにグルタミン酸生産能が高くなる傾向にあることも明らかとなった.

3. ATPase活性上昇株の細胞エネルギーレベルの解析

さらに形質転換株のより詳細なエネルギー代謝特性を調べるため, 膜電位, 細胞内pH, 細胞内ATP量の測定を行った. 膜電位, 細胞内pHの測定の結果, 膜電位, Δ pHの双方とも野性株に比べて大きく, 形質転換株のプロトン駆動力が野性株よりも高く形成されていることが示唆された. 細胞内ATP量の測定の結果, 培養後期において形質転換株のATPレベルが野性株よりも低下していることが判明した. 培養後期では生合成反応が低下するため, ATPレベルを維持する必要性も低下していると考えられ, このような状況でATPaseが過剰発現していると, ATPaseは細胞内に残っているATPを分解し尽くし, これと共役してプロトン細胞外により多く排出してしまっている可能性が考えられる. しかしながらこのメカニズムについてはより詳細な解析が必要であると思われる.

以上のように, 今回の申請者によるコリネ型グルタミン酸生産菌のエネルギー代謝変異に関する研究は, 産業的に重要なアミノ酸生産菌*C. glutamicum*のエネルギー代謝に関する知見を深めるとともに, 従来とは異なった手法によるアミノ酸の発酵生産性向上の可能性を示したものである.

よって審査員一同は, 関根寛直が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた.