

学位論文題名

Analysis of the Mechanism of Enhanced Glucose Metabolism
in an H⁺-ATPase-Defective Mutant of *Corynebacterium
glutamicum* ATCC14067 by Comparative Proteomic Approach

(*Corynebacterium glutamicum* ATCC14067のH⁺-ATPase欠損変異株に
おけるグルコース代謝促進機構の比較プロテオーム解析)

学位論文内容の要旨

微生物発酵による有用物質生産においては、生産菌の物質生産活性を高めることが重要となる。発酵原料として糖質が多用されるため、目的産物の効率的生産を達成するためには解糖系や TCA サイクルなどの中枢代謝の活性を上昇させることが有効となる。H⁺-ATPase の欠損変異により酸化的リン酸化を遮断し細胞をエネルギー欠乏に陥らせることは、中枢代謝の活性を上昇させるために有効であることが知られている。これは変異導入により解糖系による基質レベルのリン酸化が唯一の ATP 獲得経路となるため合理的な応答である。グルタミン酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* 野生株 ATCC14067 から誘導された H⁺-ATPase 欠損変異株 F172-8 株では、グルコース代謝と呼吸の活性化、またグルタミン酸生産活性の向上が認められている。本研究では比較プロテオーム解析を適用してこれらの活性上昇機構の解明を試みた。

1) *C. glutamicum* 野生株 ATCC14067 のプロテオームレファレンスマップの構築

比較プロテオーム解析には解像度の高いレファレンスマップが必要になる。そこで一次元目を等電点電気泳動、二次元目を SDS-PAGE として、*C. glutamicum* ATCC14067 株の細胞質タンパク質をできるだけ広範囲に解析できる二次元電気泳動条件を設定した。分離した各スポットは MALDI-TOF-MS によるペプチドマスフィンガープリンティング法により、ゲノムが解読されている *C. glutamicum* 基準株 ATCC13032 のゲノム情報に基づいて同定した。その結果、等電点 4.5-6 の範囲で延べ 1730 個のタンパク質が検出でき、166 個、139 種類のタンパク質スポットを同定した。これらには解糖系、TCA サイクル、H⁺-ATPase などエネルギー代謝に関わる酵素、アミノ酸やヌクレオチドの生合成に関わる酵素、DNA の複製/転写・翻訳に関わる酵素やタンパク質、輸送系、シャペロンなどが含まれていた。本株のレファレンスマップを公的データベース PRIDE に登録した (accession no. 2029)。

2) *C. glutamicum* ATCC14067 から誘導された H⁺-ATPase 欠損変異株 F172-8 における糖代謝活性化機構の比較プロテオーム解析

H⁺-ATPase 欠損変異株 F172-8 株は栄養要求物質ビオチンを十分に含むグルタミン酸非生産

条件でのジャーファーメンター培養対数増殖期において、菌体当りの糖代謝活性が 2.4 倍、呼吸活性が 1.5 倍に上昇していた。これらの上昇は定常初期においては見られなくなった。レファレンスマップを用いて、親株と変異株のタンパク質発現を対数増殖期と定常初期の二点で比較した。その結果、解糖系では pyruvate kinase (Pyk), phosphofructokinase (Pfk), fructose-bisphosphate aldolase (Fda), phosphoglycerate mutase について変異株で対数増殖期に発現上昇が認められた。これらの変化は Pyk を除き定常初期では見られなくなった。C. glutamicum において Pyk はエネルギー欠乏に応答してアロステリックに活性化される解糖系の唯一のレギュレーターであるため、本酵素の発現増大は糖代謝活性の上昇に特に寄与していると考えられた。TCA サイクルではレファレンスマップ上で検出される fumarase (Fum), malate dehydrogenase (Mdh), malate:quinone oxidoreductase (Mqo), succinate dehydrogenase (SdhB) 全てが対数増殖期に発現上昇していた。これらの変化は Mdh を除き定常初期まで継続した。C. glutamicum ではリンゴ酸とオキサロ酢酸の変換反応には Mqo と Mdh が関与しており、これらのカップリング反応により呼吸鎖と連動したユニークな NADH の再酸化系が機能していることが in vitro の実験で示されている。今回見出された両酵素の発現上昇は糖代謝活性増大に伴う呼吸の増大がどのように NADH を再酸化しているかを説明すると同時に、本カップリング反応が in vivo で機能していることを示した初めてのデータである。また、変異株では catalase (KatA) の発現上昇が認められたが、これは活発な呼吸に伴って生成する活性酸素の除去に必要であると思われた。変異株では H⁺-ATPase のいくつかのサブユニットの発現が上昇していた。これはエネルギー欠乏を酸化的リン酸化の促進により解消しようとする応答と考えられ興味深い。以上の生理的变化は本株のエネルギー欠乏への適応応答の理解に貢献するものである。

3) ビオチンを十分に含むグルタミン酸非生産条件でジャーファーメンター培養された H⁺-ATPase 欠損変異株 C. glutamicum F172-8 における中枢代謝関連酵素活性の測定

前項でプロテオーム解析により明らかにされた中枢代謝酵素発現の変動を確認するため、またプロテオーム解析では検出されないが重要と考えられる関連諸酵素の発現変動を明らかにするため、酵素活性の測定を行った。その結果、プロテオーム解析で検出されたタンパク質発現の変動とほぼ一致する酵素活性の変動を検出することができた。さらにプロテオーム解析で検出されなかった酵素として citrate synthase の活性上昇を検出した。このことは変異株における TCA サイクルフラックスの上昇を示唆している。また NAD⁺-dependent lactate dehydrogenase (LdhA) の活性上昇が検出され、乳酸生成による NADH の再酸化反応の関与が示された。さらに呼吸関連酵素では膜結合型の L-lactate dehydrogenase (LldD) の活性が上昇していた。これは生成された乳酸を呼吸鎖とリンクして酸化する LdhA/LldD のカップリング反応の作動を示すものと考えられた。一方で、NADH の酸化に機能する NADH dehydrogenase 活性は両株で変化を認めなかった。従って F172-8 株は Mqo や LldD などの膜結合性有機酸化酵素を高発現させることにより NADH の再酸化活性を上昇させているものと考えられた。

4) H⁺-ATPase 欠損変異株 C. glutamicum F172-8 におけるグルタミン酸生産能向上機構の比較プロテオーム解析

F172-8 株では親株に比べてグルタミン酸生産能が向上している。そこで比較プロテオーム解析によりその機構を検討した。その結果、既に第二項で明らかにされたタンパク質発現の変動に加えて、F172-8 株においてグルタミン酸生産期（定常期）に Fum 発現の著しい低下が検出された。これらを総合すると、F172-8 株では Pyk 等の解糖系諸酵素の発現上昇に加え、

Mqo の上昇, Mdh と Fum の低下によりオキサロ酢酸の供給が増しており, このことがグルタミン酸生産を向上させる要因となっているものと考えられた.

以上, 本研究では主としてプロテオーム解析を適用することにより, *C. glutamicum* の H⁺-ATPase 欠損変異株における糖代謝促進機構, グルタミン酸生産向上機構に関する新たな知見を得ることができた. 以上の成果は, グルタミン酸生産菌の理解ならびに有用物質生産菌の育種研究に大きく寄与するものである.

学位論文審査の要旨

主査 教授 横田 篤
副査 教授 松井 博和
副査 准教授 和田 大
副査 准教授 伊藤 浩之

学位論文題名

Analysis of the Mechanism of Enhanced Glucose Metabolism in an H⁺-ATPase-Defective Mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 by Comparative Proteomic Approach

(*Corynebacterium glutamicum* ATCC14067の H⁺-ATPase 欠損変異株におけるグルコース代謝促進機構の比較プロテオーム解析)

本論文は英文 168 頁，図 17，表 7，7 章からなり，参考論文 2 編が付されている。

微生物発酵による有用物質生産においては，解糖系や TCA サイクルなどの中枢代謝の活性を上昇させることにより生産菌の物質生産活性を高めることが重要となる。このためには H⁺-ATPase の欠損変異により酸化的リン酸化を遮断し細胞をエネルギー欠乏に陥らせることが有効である。これは変異導入により解糖系による基質レベルのリン酸化が唯一の ATP 獲得経路となるため合理的な応答である。グルタミン酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* 野生株 ATCC14067 から誘導された H⁺-ATPase 欠損変異株 F172-8 では，グルコース代謝と呼吸の活性化，またグルタミン酸生産能の向上が認められている。本研究は比較プロテオーム解析を適用してこれらの活性上昇機構の解明を試みた結果をまとめたものである。

1) *C. glutamicum* 野生株 ATCC14067 のプロテオームレファレンスマップの構築

比較プロテオーム解析に必要な解像度の高いレファレンスマップを作るため，一次元目を等電点電気泳動，二次元目を SDS-PAGE として，*C. glutamicum* ATCC14067 株の細胞質タンパク質をできるだけ広範囲に解析できる二次元電気泳動条件を設定した。分離スポットは MALDI-TOF-MS によるペプチドマスフィンガープリンティング法により，*C. glutamicum* 基準株 ATCC13032 のゲノム情報に基づいて同定した。その結果，166 個，139 種類のタンパク質スポットからなる，中枢代謝の解析に適した実用性の高いレファレンスマップを構築できた。このレファレンスマップを公的データベース PRIDE に登録した (accession no. 2029)。

2) グルタミン酸非生産条件下での H^+ -ATPase 欠損変異株 F172-8 における糖代謝活性促進機構の比較プロテオーム解析

H^+ -ATPase 欠損変異株 F172-8 は、栄養要求物質ビオチンを十分に含むグルタミン酸非生産条件下でのジャーファーメンター培養において、菌体当りの糖代謝活性、呼吸活性が親株 ATCC14067 の約2倍に上昇した。両株のタンパク質発現を比較プロテオーム解析した結果、変異株で pyruvate kinase (Pyk)を始めとする解糖系諸酵素の発現増大が認められた。本菌において Pyk はエネルギー欠乏に応答してアロステリックに活性化される解糖系唯一のレギュレーターであるため、その発現増大は糖代謝活性の上昇に特に寄与していると考えられた。TCA サイクルでは特に malate:quinone oxidoreductase (Mqo)の発現増大が重要であった。*C. glutamicum* ではリンゴ酸とオキサロ酢酸の変換反応には呼吸鎖とリンクした Mqo と通常の malate dehydrogenase (Mdh)が関与しており、これらのカップリング反応によるユニークな NADH の再酸化系が存在している。今回見出された Mqo の発現増大は糖代謝活性上昇に伴う本カップリング反応の重要性を示している。以上の生理的変化の解明は、本変異株の適応応答の理解に貢献するものである。

3) *C. glutamicum* ATCC14067 および F172-8 の中枢代謝関連酵素活性の測定

前項のプロテオーム解析の裏付をとるため、関連酵素の活性測定を行い、プロテオーム解析の結果とほぼ一致する酵素活性の変動を検出した。また NAD^+ -dependent lactate dehydrogenase (LdhA)と膜結合型の L-lactate dehydrogenase (LldD)の活性が上昇していた。これは LdhA による乳酸生成を伴う NADH の再酸化反応と、生成された乳酸を呼吸鎖とリンクして酸化する LldD のカップリング反応の作動を示すものと考えられた。従って F172-8 株は Mqo や LldD などの膜結合性有機酸酸化酵素を高発現させることにより NADH の再酸化活性を上昇させているものと考えられた。

4) *C. glutamicum* F172-8 におけるグルタミン酸生産能向上機構の比較プロテオーム解析

F172-8 株のグルタミン酸生産能向上機構について解析を行った結果、第二項と類似の変動が見出された。また、F172-8 株においてグルタミン酸生産期に乳酸副成の著しい低下が観察された。これらを総合すると、F172-8 株では Mqo/Mdh による NADH の再酸化の比率が上昇し、このことがピルビン酸の供給を増大させ、グルタミン酸生産を向上させる要因となっているものと考えられた。

以上、本研究では主としてプロテオーム解析を適用することにより、*C. glutamicum* の H^+ -ATPase 欠損変異株における糖代謝活性促進機構、グルタミン酸生産能向上機構に関する新たな知見を得ることができた。以上の成果は、グルタミン酸生産菌の理解ならびに有用物質生産菌の育種研究に大きく寄与するものである。

よって審査員一同は、李立源が博士（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。