

学位論文題名

Alterations of central metabolism in a pyruvate kinase
gene deletion mutant and an H⁺-ATPase-defective
mutant of *Corynebacterium glutamicum*

(*Corynebacterium glutamicum*のピルビン酸キナーゼ遺伝子欠失変異株及び
H⁺-ATPase欠損変異株における中枢代謝の変化)

学位論文内容の要旨

Corynebacterium glutamicum は工業的アミノ酸発酵の生産宿主として広く用いられており、産業上重要な微生物である。*C. glutamicum* が発見されて以来、アミノ酸生産、特にグルタミン酸とリジンに関して、高い生産能を持つ株の育種がさかんに行われてきた。育種の過程で *C. glutamicum* に関する代謝の特徴が明らかになったが、未だ不明な点も多い。中枢代謝もその例の一つであり、様々な生命現象の基盤となる重要な代謝経路であるにもかかわらず、これまでに得られている知見は限られている。本論文ではこの中枢代謝の中でも解糖系の鍵酵素と考えられているピルビン酸キナーゼ (PYK) と酸化的リン酸化による ATP 合成を担う F₀F₁-ATP 合成酵素 (H⁺-ATPase) に着目した。これらの変異が中枢代謝に与える影響とそれが起こるメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

1) ビオチン欠乏条件下における *pyk* 欠失がもたらす代謝への影響

PYK 変異そのものがもたらす代謝への影響を調べるため、*C. glutamicum* の基準株である ATCC 13032 株 (以下 13032 株とする) を親株として用いた。この親株の PYK をコードする遺伝子 *pyk* を二重相同組換え法により欠失させ、PYK 活性が検出限界以下となった D1 株を作成した。また D1 株に *pyk* 遺伝子をもつ発現用プラスミドで形質転換し、PYK 活性を相補させた株 (C1 株) を作成した。これら 3 株を用い、グルタミン酸生産条件であるビオチン欠乏条件下で培養を行った。培地は発酵生産に用いられる複合培地 (F4 培地) を用いた。その結果、D1 株は野生株と比較して生育が減少 (15%減) したものの、菌体あたりの糖消費速度は 25%上昇していた。またグルタミン酸生産量、アスパラギン酸生産量はそれぞれ親株の 1.3 倍、4.2 倍に上昇していた。酵素活性測定、転写量測定の結果から、*pyk* 欠失によってホスホエノールピルビン酸 (PEP) が蓄積し、この蓄積を解消するために PEP カルボキシラーゼ (PEPC) と PEP カルボキシキナーゼ (PEPCK) が協調的に活性を変化させたと考えられた。これは PEP を消費しオキサロ酢酸を生成する方向に代謝を傾ける効果があると推測された。特に PEPCK に関しては転写レベルでも発現量が制御されていることが示唆された。同様に、PEP の蓄積によって phosphotransferase system による糖の取り込みが促進され、PEP を消費してピルビン酸を生成する反応が増大したと考えられた。これら変化によりオキサロ酢酸とアセチル CoA の供給バランスが改善し、TCA サイクルがより効率よく機能したためグルタミン酸の生産量が増大したと考えられた。オキサロ酢酸の供給量が増加したことはオキサロ酢酸を前駆体とするアスパラギン酸の生成量を増大させたことにもつながったと考えられた。C1 株は野生株とほぼ同様の表現型を示したことから、D1 株で見られた代謝変化は *pyk* 欠失によることが示された。

2) ビオチン十分条件下における *pyk* 欠失がもたらす菌体形成量増大効果

次に 13032 株、D1 株、C1 株を用い、生育により適した条件であるビオチン十分条件下において、*pyk* 欠失が代謝に与える影響について明らかにすることを試みた。培地は F4 培

地を用いた。培養の結果、D1株において生育量が大幅に増加し(37%増)、菌体あたりの糖消費速度も増大した(35%増)。反対に呼吸活性は低下していた(55%減)。生育量の増加は乾燥菌体重量でも評価し、D1株において18%増加していることを確認した。酵素活性測定、転写量測定の結果、ピオチン欠乏条件と同様、PEPCとPEPCKの協調的な活性の変化が観察された。オキサロ酢酸の代謝に関与する、リンゴ酸-キノン酸化還元酵素(MQO)の活性も低下していた。またピオチンを補酵素とするピルビン酸カルボキシラーゼ(PCx)の活性低下も転写量測定から示唆された。このことからピオチン欠乏条件と同様に、*pyk*欠失によってPEPの蓄積が起これ、この蓄積を解消するためにPEPCとPEPCKの活性が変化したと考えられた。この結果オキサロ酢酸の供給量が増大し、過剰なオキサロ酢酸が生成されることを防ぐため、MQOおよびPCxの活性が低下したと推測された。MQOはリンゴ酸をオキサロ酢酸に酸化する際、電子を呼吸鎖にあるメナキノンに伝達する。このことからMQOの活性低下はD1株における呼吸活性の低下と関連している可能性が示唆された。またグルタミン酸非生産条件であることとMQOの活性低下の相乗効果により菌体形成の前駆体となる代謝中間体の濃度が上昇し、菌体形成量の増大につながったと考えられた。またC1株は野生株とほぼ同様の表現型を示したことから、D1株で見られた代謝変化は*pyk*欠失によることが示された。

3) H^+ -ATPase 欠損変異株が示す呼吸活性増大メカニズムの解明

C. glutamicum の H^+ -ATPase 欠損変異株においては糖消費速度の上昇と呼吸活性の増大が起これることが知られている。そこでこの現象のメカニズムについて解明を試みた。13032株と、この株を親株とし、 H^+ -ATPase の活性を低下させる点変異を遺伝子操作によって導入したA-1株を使用し、13032株とA-1株の発酵特性について調べた。培養の結果、A-1株は13032株と比べ、生育速度は50%低下し、菌体あたりの糖消費速度は1.9倍になった。呼吸活性も1.4倍に上昇していた。一般的にNADHの再酸化に関与する酵素であるNDH-IIの活性には変化が見られなかった。これに対して、NADHの再酸化と呼吸に関与するTCAサイクルのMQO/リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(MDH)と解糖系近傍のL-乳酸デヒドロゲナーゼ(LldD)/乳酸デヒドロゲナーゼ(LdhA)の酵素活性および転写量はA-1株で有意に上昇していた。このことから、基質的リン酸化によるATP合成が促進された結果、菌体内のNADH濃度が上昇し、MQO/MDHおよびLldD/LdhAの2つのカップリング反応が過剰なNADHを再酸化していることが示唆された。また、末端酸化酵素全体の活性も上昇していた。転写量測定の結果から、その上昇は、プロトン駆動力形成能が低いシトクロム*bd*オキシダーゼの上昇に起因していると推測された。このことから呼吸活性の増大はMQO/MDH、LldD/LdhAのカップリング反応の亢進とシトクロム*bd*オキシダーゼの活性上昇によると考えられた。

これらの研究を通じて *C. glutamicum* は代謝のかく乱に対して、中枢代謝を駆使し代謝バランスを維持しようとするのが明らかになった。また *pyk* 欠失と H^+ -ATPase 欠損の両研究を通して、TCA サイクルの一反応を担う MQO の比活性と呼吸活性との間に正の相関が見られたことは興味深い現象である。これらの知見は *C. glutamicum* の基礎的な生理特性の理解、および *C. glutamicum* によるさらなる発酵生産の効率化に貢献すると期待できる。

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	客員准教授	湯本	勳

学位論文題名

Alterations of central metabolism in a pyruvate kinase gene deletion mutant and an H⁺-ATPase-defective mutant of *Corynebacterium glutamicum*

(*Corynebacterium glutamicum*のピルビン酸キナーゼ遺伝子欠失変異株及び H⁺-ATPase欠損変異株における中枢代謝の変化)

本論文は、英文 145 ページ、図 11、表 12、5 章からなり、参考論文 2 編が付されている。*Corynebacterium glutamicum* は工業的アミノ酸発酵の生産宿主として広く用いられており、産業上重要な微生物であるが、中枢代謝を含む代謝機構については未解明な点が多い。本研究は中枢代謝の中でも解糖系の鍵酵素と考えられているピルビン酸キナーゼ (PYK) と酸化的リン酸化による ATP 合成を担う F₀F₁-ATP 合成酵素 (H⁺-ATPase) に着目し、これらの変異が代謝に与える影響とそれが起こるメカニズムについて明らかにしたものである。

1) ビオチン欠乏条件における *pyk* 欠失がもたらす代謝への影響

PYK 変異そのものがもたらす代謝への影響を調べるため、*C. glutamicum* の基準株である ATCC 13032^T 株 (野生株) を親株とする、*pyk* 欠失変異株 (D1 株) と D1 株に PYK 活性を相補させた株 (C1 株) を作成した。これらをビオチン欠乏によるグルタミン酸生産条件で培養を行った。その結果、D1 株は野生株と比べ生育が減少したが、菌体あたりの糖消費速度は上昇した。グルタミン酸生産量、アスパラギン酸生産量は D1 株において増加した。このメカニズムとして PEP カルボキシラーゼ (PEPC) と PEP カルボキシキナーゼ (PEPCK) が協調的に活性を変化させ、PEP の蓄積を回避したと推測した。同様に、phosphotransferase system によって糖の取り込みが促進され、PEP からピルビン酸を生成する反応が増大したと考えた。これら変化により OAA とアセチル CoA の供給バランスが改善し、TCA サイクルがより効率よく機能したためグルタミン酸の生産量が増大したと考察した。OAA の供給量が増加したことは OAA を前駆体とするアスパラギン酸の生成量増大にもつながった。PYK 変異単独の効果でグルタミン酸生産が増大することは新規な知見である。

2) ビオチン十分条件における *pyk* 欠失がもたらす菌体形成量増大効果

次に野生株、D1 株、C1 株を用い、生育により適したビオチン十分条件における、*pyk*

欠失が代謝に与える影響について調べた。培養の結果、D1株において生育量が大幅に増加し、菌体あたりの糖消費速度も増大した。反対に呼吸活性は低下していた。酵素活性測定、転写量測定の結果、PEPCとPEPCKの協調的な活性の変化が観察された。OAAの代謝に関与する、リンゴ酸-キノン酸化還元酵素(MQO)の活性も低下していた。またピルビン酸カルボキシラーゼ(PCx)の活性低下も転写量測定から示唆された。このことからPEPの蓄積を解消するためにPEPCとPEPCKの活性が変化し、OAAの供給量が増大したと推測している。MQOおよびPCxの活性低下はOAAの過剰生成を防ぐためと考察している。MQOはリンゴ酸をOAAに酸化する際、電子を呼吸鎖にあるメナキノンに伝達するため、MQOの活性低下がD1株における呼吸活性の低下と関連する可能性を示唆している。PYK変異でバイオマス生産が増加することを発見したのは新規の知見である。

3) H⁺-ATPase欠損変異株が示す呼吸活性増大メカニズムの解明

*C. glutamicum*のH⁺-ATPase欠損変異株において、糖消費速度の上昇と呼吸活性の増大が起こるメカニズムについて解明を試みた。野生株と、この株を親株とし、H⁺-ATPaseの活性を低下させたA-1株を使用し、発酵特性について調べた。培養の結果、A-1株は13032株と比べ、生育速度は半減し、菌体あたりの糖消費速度は1.9倍になった。呼吸活性も上昇した。NADH再酸化酵素のNDH-IIの活性には変化が見られなかった。これに対して、NADHの再酸化と呼吸に関与するMQO/リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(MDH)とL-乳酸デヒドロゲナーゼ(LldD)/乳酸デヒドロゲナーゼ(LdhA)の酵素活性および転写量がA-1株で有意に上昇していた。このことから、基質レベルのリン酸化によるATP合成が促進された結果、菌体内のNADH濃度が上昇し、前述のカップリング反応が過剰なNADHを再酸化していることが示唆された。また、末端酸化酵素全体の活性も上昇していた。転写量測定の結果から、その上昇はプロトン駆動力形成能が低いシトクロム*bd*オキシダーゼの上昇に起因していると推測している。以上から呼吸活性の増大はMQO/MDH、LldD/LdhAのカップリング反応の亢進とシトクロム*bd*オキシダーゼの活性上昇によると考察している。MQO活性と呼吸活性の関連を明確に示したのは新規の知見である。

以上の研究を通じて*C. glutamicum*は代謝のかく乱に対して、中枢代謝を駆使し代謝バランスを維持しようとするのが明らかになった。また*pyk*欠失とH⁺-ATPase欠損の両研究を通して、TCAサイクルの一反応を担うMQOの比活性と呼吸活性との間に正の相関が見られたことは興味深い現象である。これらの知見は*C. glutamicum*の基礎的な生理特性の理解、および*C. glutamicum*によるさらなる発酵生産の効率化に貢献すると期待できる。

よって審査員一同は、澤田和典氏が博士(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。