

pdhR 欠損変異が大腸菌の糖代謝におよぼす影響

生命分子化学講座 微生物生理学分野

清水久美子

【背景・目的】ピルビン酸脱水素酵素 (PDH) 複合体はピルビン酸をアセチル CoA に変換する異化代謝のキーエンザイムである。大腸菌の PDH 複合体は三つの酵素で構成され、それぞれの遺伝子は一つのオペロンを形成しており、その先頭にある *pdhR* がコードする PdhR によって負の転写制御を受ける。最近 PdhR の新たな制御標的遺伝子として、二種類ある NADH デヒドロゲナーゼ (NDH-I, II) のうちの一つである NDH-II およびシトクローム *bo* オキシダーゼが見出された。これらは共に呼吸鎖酵素であることから、PdhR はピルビン酸の好氣的分解、すなわち中枢代謝の制御因子であることが明らかになった。*pdhR* 欠損変異を導入した株ではピルビン酸代謝の活性化により糖代謝活性の増加が期待されたので、*pdhR* 変異を導入した大腸菌変異株を構築し、関連諸酵素活性および糖代謝活性におよぼす影響を検討した。

【方法】 λ Red リコンビナーゼを用いて、*Escherichia coli* W1485 を親株として *pdhR* を欠損した W1485 Δ *pdhR* (以下変異株) を取得した。まず親株および変異株を坂口フラスコで培養して PDH および NDH の活性測定を行い、目的の変異株の取得を確認した。次にジャーファーメンター培養を行い、発酵特性、呼吸活性ならびに関連諸酵素の活性測定を行った。

【結果】坂口フラスコ培養菌体を用いて酵素活性を測定した結果、変異株では親株と比較して PDH が 2.1 倍、NDH-II が 2.8 倍に活性が増加していた。ジャー培養を行ったところ、両株の生育に大きな違いは見られなかったが、変異株が 50 g/L の糖を消費するのに要する時間は、親株より 2 時間早い 16 時間であった。対数期における菌体当たりの平均糖消費速度 (Δ g/ Δ OD/ Δ h) は変異株で 1.2 倍に増加した。また、定常期以降親株では糖消費速度に遅延が見られたのに対し、変異株では見られず、平均 OD 当たりの糖消費速度 (Δ g/OD/ Δ h) は親株と比較して 1.4 倍に増加していた。変異株の呼吸活性は親株と比較して対数期に 1.2 倍、定常期に 1.3 倍に上昇していた。酵素活性測定を行ったところ、変異株は親株と比較して、PDH は対数期に 2.5 倍、定常期に 6.5 倍、NDH-II は対数期および定常期に共に 4.0 倍、NDH の合計活性も 3.0 倍に増加した。また、クエン酸合成酵素 (CS) 活性は対数期に 1.5 倍、定常期に 2.0 倍に上昇していた。

【考察】*pdhR* 欠損株では予想通り PDH および NDH-II の活性が増大し、目的とする変異株の取得を確認した。ジャー培養による評価により、本変異は PDH および呼吸活性の増大により糖代謝活性を増大させることが明らかになった。特に定常期における糖代謝活性に顕著な差がみられ、その要因は呼吸と PDH 活性の維持によるものと考えられた。大腸菌の CS は NADH でフィードバック阻害を受けるが、変異株では呼吸の活性化により NADH の細胞内濃度が低く抑えられ、なおかつ活性上昇が起こるため、TCA 回路への流量が増加していると考えられる。