

Corynebacterium glutamicum ピルビン酸キナーゼ欠失変異株の グルタミン酸生産条件における代謝変化

生命分子化学講座 微生物生理学分野
澤田和典

(背景と目的) ピルビン酸キナーゼ (PYK) は中枢代謝 (Fig) である解糖系の好気条件における最終反応を触媒する酵素であり, *Corynebacterium glutamicum* では唯一, 解糖系の流量調節を行うと考えられている酵素である. 我々の研究室は従来の特定の代謝経路に着目したアプローチとは異なり, 中枢代謝の増強による発酵生産の効率化をテーマとしている. 本研究では *C. glutamicum* の PYK を欠失した変異株が, ビタミンの一種であるビオチンの添加量を制限したグルタミン酸生産条件で培養すると, どのような代謝特性を示すのかを解析した. また本研究を通して PYK 欠失変異がアミノ酸の工業的生産に応用可能であるか検証することを目的とした.

(方法) 野生株である *C. glutamicum* ATCC 13032 株から *pyk* 遺伝子を欠失させた欠失変異株と欠失変異株に *pyk* 遺伝子をプラスミドで導入した相補株を用いた. 2L ジャーファーマンターで培地中のビオチン量を制限したグルタミン酸生産条件で培養を行い, 糖消費や発酵産物の測定, 酵素活性測定および定量的リアルタイム PCR 法による転写量測定を行い, PYK 欠失変異株の代謝変化を評価した.

(結果) 欠失変異株の最大生育量はわずかに減少した. しかし, 菌体あたりの糖消費速度, およびグルタミン酸生産速度はむしろ上昇した. グルタミン酸生産量は欠失株で野生株の 1.3 倍に, アスパラギン酸分泌量は 4.2 倍に上昇した. 酵素活性ではホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) の活性上昇, およびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) の活性低下が見られた. PEPCK に関してはコードする遺伝子の転写量減少も見られた.

(考察及び結論) PYK 欠失によってホスホエノールピルビン酸 (PEP) の代謝が滞り, 菌体内に PEP が蓄積すると予想される. PEPC, および PEPCK の活性変化は PEP の蓄積を回避するための結果であると考えられる. 解糖系の調節に重要な PYK を欠失しても生育がほとんど変わらず, 糖消費速度が上昇したことは *C. glutamicum* のもつ柔軟な代謝調節能を示していると考えられる. またその結果 PYK 欠失変異株がグルタミン酸生産量の増大を示したことから, PYK 欠失は工業的生産に応用しうる, 有効な変異であることが示唆された.

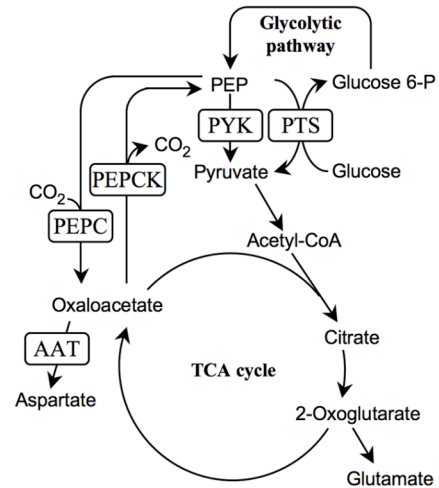


Fig. 本研究に関連する代謝経路
PEP: phosphoenolpyruvate, PTS: phosphotransferase system, PYK: pyruvate kinase, PEPC: PEP carboxylase, PEPCK: PEP carboxykinase, AAT: aspartate aminotransferase