

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのアスパラギン酸によるフィードバック阻害解除が *Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸生産に与える影響

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 微生物生理学 小倉 紘太郎

1. 背景

Corynebacterium glutamicum において、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) はホスホエノールピルビン酸からオキサロ酢酸 (OAA) への反応を触媒する酵素である。また、本酵素は複数の代謝中間体によって活性調節をうけることから、PEPC はトリカルボン酸 (TCA) サイクルへの炭素補充を調節する重要な酵素であると考えられてきた (Fig.)。

本研究の目的は、PEPC のアスパラギン酸 (Asp) によるフィードバック阻害解除 (PEPC^R) による補充経路の強化が *C. glutamicum* の生育とアミノ酸生産に与える純粋な影響を評価することである。

2. 実験

過去にランダム変異により取得された PEPC^R 変異株である *Brevibacterium flavum* 2247 no. 70 株の PEPC 遺伝子における変異点を同定した。この変異を二重相同組換え法を用い、野生株 *C. glutamicum* ATCC 13032 に導入することで、PEPC^R 変異株 R1 を得た。更に、ピルビン酸キナーゼ (PYK) 欠損株 D1 株を親株とする PEPC^R 株 DR1 株を構築した。これら変異株をグルタミン酸 (Glu) 生産条件 (ビオチン制限条件) で培養することにより、発酵特性の解析をおこなった。

3. 結果と考察

野生株の PEPC 活性は、Asp 20 mM 存在下で元の活性の 24.0% にまで低下したのに対し、R1 株由来の PEPC は Asp 40 mM 存在下で 41.5% の活性を維持していた。Glu 発酵培地を用いた培養をおこなったところ、野生株と R1 株の Glu 生産量はそれぞれ 26.0 g/L, 31.0 g/L であった。また Asp 生産量はそれぞれ 0.4 g/L, 1.2 g/L であった。一方、PEPC を含めた OAA 周辺酵素の活性測定を行った結果、酵素活性の有意な変化は見られなかった。DR1 株では Glu, Asp の更なる生産量向上がみられ、R1 株と同様に OAA 周辺酵素の活性向上はみられなかった。

以上の結果から、PEPC^R 導入によるアミノ酸の生産量向上は OAA 周辺酵素の活性変化によるものではなく、フィードバック阻害解除による OAA への炭素流量増加によるものであることが示唆された。更に、DR1 株は D1 株、R1 株と比べ Glu, Asp 生産量がより向上したことから、PEPC^R と PYK 欠損変異の組合せは菌体内において OAA への炭素流量を相乗的に強化し、両アミノ酸生産に有効であることが示された。

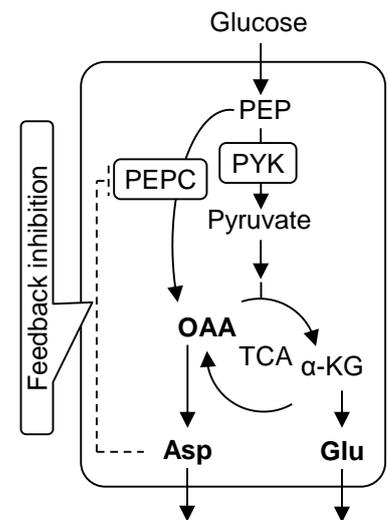


Fig. The central metabolism of *C. glutamicum*