

Corynebacterium glutamicum のピルビン酸キナーゼ遺伝子欠失と フィードバック阻害非感受性ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼが リジン生産に与える影響

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 微生物生理学 柳瀬 真紀

1. 目的

オキサロ酢酸 (OAA) はリジンやスレオニンを始めとしたアスパラギン酸属アミノ酸の前駆体であり、我々はグルタミン酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* において OAA の供給を強化する代謝改変を利用した物質生産の効率化を目指している。当研究室のこれまでの研究により、ピルビン酸キナーゼ欠失変異 (Δ PYK) およびホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのフィードバック阻害非感受性変異 (PEPC^{db}) がグルタミン酸およびアスパラギン酸生産に有効であることが明らかになり、リジン生産への応用が期待された。しかし、 Δ PYK 変異がリジン生産に与える影響については諸説あり、未だ明確な答えが出ていない。そこで、本研究では、 Δ PYK 変異がリジン生産に与える影響を解析した。また、PEPC^{db} 変異の効果も合わせて検討した。

2. 方法

リジン生産変異であるアスパラギン酸キナーゼ変異 (AK^{db}) を組み込んだ *C. glutamicum* ATCC 13032 AK^{db} を親株 (P) とし、二重相同組換え法により AK^{db}/ Δ PYK (D2), AK^{db}/PEPC^{db} (R2), AK^{db}/ Δ PYK/PEPC^{db} (DR2) の各変異株を構築した。これらの株を 2L 容ジャーファーメンターを用いてリジン生産培地で培養し、その発酵特性の解析を行った。

3. 結果

解析の結果、生育に関しては P 株と各変異株で大きな差は見られなかった。また、リジン生産において、D2 株では親株 P とほとんど差が見られなかった。一方、R2 株と二重変異株 DR2 では、それぞれ 15%, 31% 生産量が増加していた (Table 1)。また、これらの結果から、 Δ PYK 変異と PEPC^{db} 変異は相乗的にリジン生産に寄与することが示唆された。

OAA 周辺の酵素活性を測定したところ、D2, DR2 株で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、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) から OAA 方向への流量が増強されたと考えられた。更に、これら 2 株では、リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) には差が見られなかったが、リンゴ酸:キノン酸化還元酵素 (MQO) 活性が低下していた。これは OAA の過剰な蓄積を回避するための応答であると考えられた。以上の結果から、 Δ PYK 変異は PEPC^{db} 変異と共存する場合に、有効変異となりうる事が明らかになった。

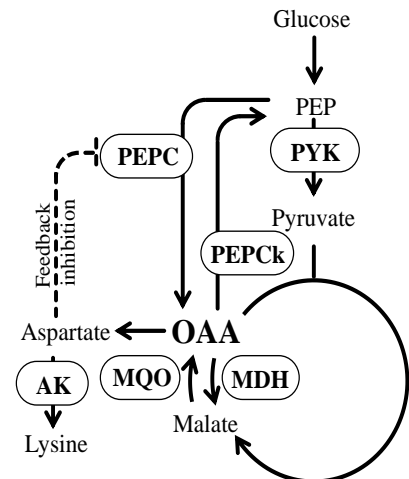


Fig. 1. Central metabolism leading to lysine biosynthesis in *C. glutamicum*.

Table 1.. Maximum lysine production in different strains.

	P	D2	R2	DR2
Lysine (g/L)	9.27	9.76	10.68	12.12
Relative productivity (%)	100	105	115	131