

Corynebacterium glutamicum のリンゴ酸脱水素酵素遺伝子および ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子の欠失が 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 佐藤 桃梨

1. 背景と目的

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, *Corynebacterium glutamicum* における OAA 供給強化は, これらの物質生産効率化に有効である。これまで我々は, OAA 供給を強化すると考えられる 3 つの変異, ピルビン酸キナーゼ遺伝子の欠失変異 (Δ PKY), 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解除変異 ($PEPC^{fb}$), クエン酸シンターゼの活性低下変異 (CS^{low}) に着目し, 3 つの変異はリジン生産効率向上に相乗的に効果があることを示した。本研究では更なる OAA 供給によるリジン生産効率化を目指した。OAA の流出経路に着目し (1) リンゴ酸脱水素酵素遺伝子の欠失変異 (Δ MDH), (2) ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子の欠失変異 (Δ PEPCK) がリジン生産に与える影響を明らかにすることを本研究の目的とした (FIG)。

2. 方法

(1) *C. glutamicum* ATCC 13032 にアスパラギン酸キナーゼのフィードバック阻害解除変異 (AK^{fb}) を導入したリジン生産株 (P 株) と, 同生産株に Δ PKY, $PEPC^{fb}$, CS^{low} を導入した三重変異株 (DRL 株) を親株として用いた。二重相同組換え法により Δ MDH 変異を導入し, 構築した株をそれぞれ P Δ MDH 株, DRL Δ MDH 株とした。これらの 4 株を 2 L 容ジャーフェーマンターを用いて, リジン発酵培地で培養し, その発酵特性の解析を行った。さらに, 酵素活性測定ならびに比較メタボローム解析により Δ MDH 導入による代謝様式の変化を調べた。

(2) (1) と同様にして P Δ PEPCK 株, DRL Δ PEPCK 株を構築し, 親株を含めた 4 株を 2 L 容ジャーフェーマンターを用いて, リジン発酵培地で培養し, その発酵特性の解析を行った。

3. 結果と考察

(1) P 株に Δ MDH を導入すると, 予想に反しリジン生産量は減少した。酵素活性測定の結果, P Δ MDH 株では OAA をホスホエノールピルビン酸へと変換する PEPCK の活性上昇が観察され, この上昇がリジン生産量減少に結びついたと考えられた。DRL 株に Δ MDH を導入するとリジン生産量に変化は見られなかった。DRL 株と DRL Δ MDH 株の比較メタボローム解析の結果, DRL Δ MDH 株でアスパラギン酸が増加していた一方で, リジン生合成のもう一つの基質であるピルビン酸が減少していた。 Δ MDH がリジン生産量増加に効果がなかったのはピルビン酸の不足が影響したためと考えられた。

(2) P 株と P Δ PEPCK 株, DRL 株と DRL Δ PEPCK 株のリジン生産量を比較すると, Δ PEPCK 導入によりそれぞれ 17%, 4%リジン生産量が増加した。 Δ PEPCK は Δ PKY, $PEPC^{fb}$, CS^{low} とともに OAA 供給に有効な変異であることが示された。

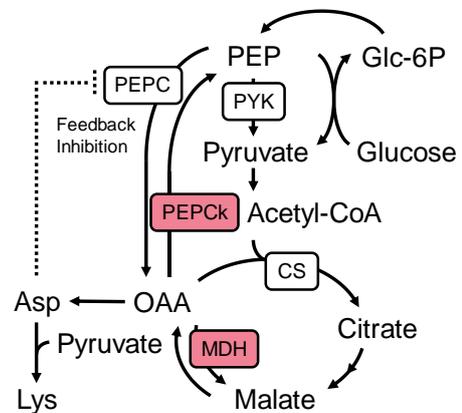


FIG. The central metabolic pathway leading to lysine formation in *C. glutamicum*