

大腸菌の呼吸鎖変異株 Δ NDH-I Δ Cytb₃ の糖代謝における グルタミン酸代謝系の機能解析

共生基盤学専攻 食品安全・機能性開発学講座 胃腸内圏微生物学 和田 浩

1. 背景と目的

ATPの合成には、細胞膜を隔てたH⁺の濃度勾配(Δ pH)と膜電位($\Delta\psi$)からなるプロトン駆動力(pmf)が必要である。当研究室では呼吸鎖変異株を用いて、大腸菌のpmf形成能に関わる呼吸鎖と糖代謝の関連について研究が進められてきた。呼吸鎖変異株の中でも、*Escherichia coli* W1485株(野生株)からpmf形成能が高い呼吸鎖酵素NDH-IとCytb₃を欠損させた株($\Delta\Delta$ 株)では糖代謝が大きく変化し、50g/Lのグルコースから7g/Lのグルタミン酸(Glu)生成など他の株では見られない特異な形質を示した。網羅的な解析によって、 $\Delta\Delta$ 株はGlu脱炭酸反応/膜輸送系(*gadAB*, *gadC*)およびGABAシャント(*gabT*)の反応系を活性化させることで(FIG.),呼吸鎖変異で著しく低下したpmf形成能を補完していると示唆された。*gadC*の対向輸送による $\Delta\psi$ 生成,*gadAB*の細胞内H⁺消費による Δ pH生成,*gabT*と*gadAB*が共役したサイクル反応による Δ pH生成の促進が行われていると考えられた。しかし、本来Glu脱炭酸反応/膜輸送系は大腸菌における酸耐性機構であり、GABAシャントは嫌気条件下におけるTCAサイクルのバイパス経路であるため、 $\Delta\Delta$ 株に及ぼす実際の影響は不明であった。そこで、本研究は遺伝子破壊系を通じて、 $\Delta\Delta$ 株の糖代謝における両反応系の機能を解明することを目的とした。

2. 方法

$\Delta\Delta$ 株を親株として、*gadAB*, *gadC*および*gabT*のそれぞれについて欠損株を構築した。野生株、 $\Delta\Delta$ 株および各欠損株の計5株を、50g/Lのグルコースを炭素源とした無機塩発酵培地を用いた酸素十分条件でバッチ培養を行い、代謝解析に供した。

3. 結果と考察

*gadC*欠損株では生育や代謝の各パラメーターに変化が見られず、 $\Delta\Delta$ 株で*gadC*は重要ではないことが明らかとなった。また、*gadAB*欠損株は若干の生育低下および2-オキソグルタル酸(Gluの前駆体)生成の減少に留まった。このことから、代替経路が働くことで*gadAB*欠損の影響が抑制されたと推測された。一方、*gabT*欠損株は生育が大幅に低下し、糖消費時間も遅延した。これは、TCAサイクルのバイパスやサイクル反応が消失したことで、pmf形成能が低下したためと考えられた。また菌体当たりのGlu生成量が $\Delta\Delta$ 株と比較して60%増加しており、このGluへの炭素の流出が生育悪化の一因と推測された。以上より、本来嫌気条件下の反応系であるGABAシャントが、好気条件下の $\Delta\Delta$ 株における糖代謝で重要な役割を担うことが明らかとなった。

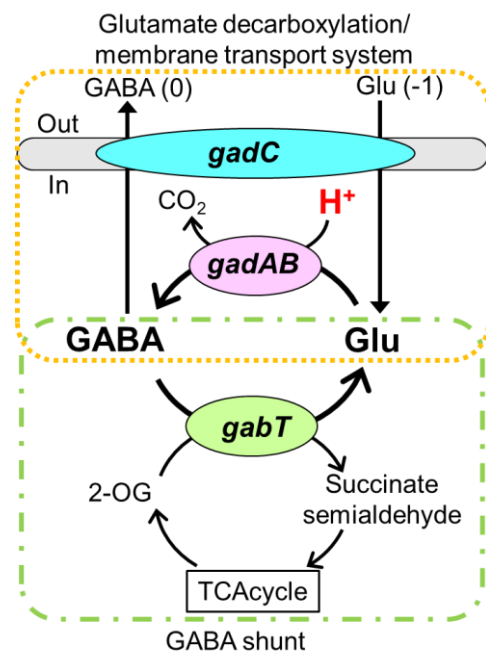


FIG. Glutamate decarboxylation/membrane transport system and GABA shunt in *E. coli*. Numbers in the parenthesis indicate the difference of electric charges. GABA; γ -aminobutyrate. 2-OG; 2-oxoglutarate.