

大腸菌の呼吸鎖変異株 Δ NDH-I Δ Cyt bo_3 における酸化還元バランスの調節が中枢代謝に与える影響

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 微生物生理学 濱田 和宏

1. 背景と目的

大腸菌の呼吸鎖はプロトン駆動力 (pmf) 形成を通じた酸化的リン酸化による ATP の生成や NADH の再酸化に関与し, 細胞内のエネルギーレベル (ATP/ADP) や酸化還元バランス (NAD^+/NADH) を通じて中枢代謝に影響を与えている。しかし, 呼吸鎖と糖代謝の相互関係は不明な部分が多く, 発酵生産菌育種のための基盤知見として更なる理解が求められている。我々はこの相互関係を検証するため, 呼吸鎖酵素のうちプロトン駆動力形成能が高い NADH 脱水素酵素 I (NDH-I) とシトクロム bo_3 オキシダーゼ (Cyt bo) の二重欠損株 ($\Delta\Delta$ 株) を構築し, 代謝解析を行った (Fig.)。その結果, 生育の低下と NADH の蓄積による菌体内の還元化が観察され, 50 g/L のグルコースを含む無機塩発酵培地で, 10 g/L の酢酸と 7 g/L ものグルタミン酸 (Glu) が生成する異常な糖代謝が確認された¹⁾。これは, 呼吸鎖改変がもたらしたエネルギーレベルの低下と酸化還元バランスの偏りによるものと推測されるが, その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。そこで, 本研究では酸化還元バランスの偏りに着目し, その解消による酢酸や Glu 生成などの代謝変化を解析し, 呼吸鎖と中枢代謝の関連についての基盤知見の獲得を目的とした。

2. 方法

エネルギーレベルに影響を与えず NADH 酸化能を強化するため, pmf 形成能をもたない NDH-II のプラスミドによる過剰発現株を構築した。*Escherichia coli* W1485 (野生株) と $\Delta\Delta$ 株, NDH-II 過剰発現 $\Delta\Delta$ 株 (NDH+株) についてジャーファーマンターによるバッチ培養を行った。

3. 結果と考察

IPTG を終濃度 100 μM となるように添加し, NDH-II の発現を誘導した NDH+株は IPTG 無添加の場合と比べて生育と糖消費が野生株と同程度まで改善した。NDH 活性は大きく増加し, NDH-II の発現が確認された。また, 呼吸活性の上昇が見られ, 呼吸鎖が活性化していると考えられた。細胞外代謝産物ではピルビン酸や酢酸の生成量が減少し, 一方で TCA サイクルの中間体である 2-オキソグルタル酸の増加が確認された。さらに, 細胞内 NAD^+/NADH 比は野生株と同程度となり, 目的通り酸化還元バランスの偏りを解消することに成功した。

以上の結果から, NDH-II の過剰発現により NADH の蓄積が解消し, TCA サイクルの初発反応を担うクエン酸合成酵素の NADH による阻害が解除され, TCA サイクルのフラックスが増加したと推測された。それにより, 酢酸の大幅な減少, および菌体を形成する前駆体物質の供給強化による生育の改善がおきたと考えられる。一方で, Glu の生成は変わらず見られたため, 酸化還元バランスが Glu 生成に与える影響は限定的と考えられた。

1) Kihira *et al.*, *J Biotechnol*, **58**, 215-223 (2012)

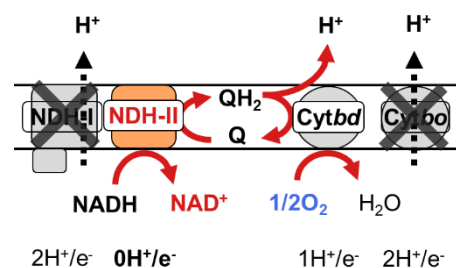


Fig. Components of respiratory chain in *E. coli* W1485 $\Delta\Delta$