

大腸菌とコリネ型グルタミン酸生産菌のエネルギー代謝工学

横田 篤*・和田 大

生物反応を利用して「ものづくり」を行うバイオプロセスにおいては、化学反応に比べて反応速度が遅いこと、しばしば低収率であることなどが実用化の妨げになっている。このため微生物発酵による有用物質生産においては、生産菌の物質生産活性を高めることが重要になる。筆者らはこれまで、産業上重要な大腸菌とグルタミン酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* を用い、有用物質の生産活性強化に関する基盤研究を展開してきた。その中心となる考え方は、中枢代謝の強化により、発酵原料の速やかな消費と前駆体供給の増強を図ることで生産性の改善を図ろうとするものである(図1)。これまでの研究により、その実現手段としてエネルギー代謝の制御が有効であることを見だし、「エネルギー代謝工学」ともいうべき代謝工学研究の新しい領域を拓いてきた。たとえば今日の有用物質生産菌の育種研究において、中枢代謝カーボンフローの強化やNADHなどの補酵素リサイクルの円滑化は常套手段となっているが、筆者らの研究がこのような視点を一般化させるために少なからず貢献してきたのではないかと考えている。さらに、研究を進める中で、エネルギー代謝の制御にともなう大腸菌とグルタミン酸生産菌の代謝変動に関して、多くの新知見を得て、両者の代謝特性の興味深い差異を明らかにすることができた。これらの知見は、発酵生産菌を育種する上での基盤情報として産業上重要であるだけでなく、代表的な産業用微生物の中枢代謝の制御に関する情報として学術的な面においても重要である。以下、大腸菌とグルタミン酸生産菌に分け、それらの概要を記す。

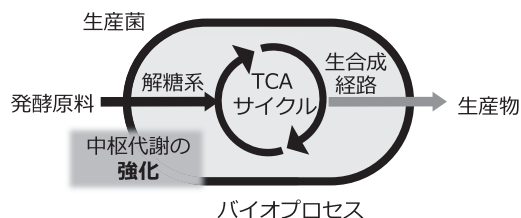


図1. 有用物質生産菌の生産活性強化の方策：中枢代謝の強化による発酵原料の速やかな消費と前駆体供給の増強。

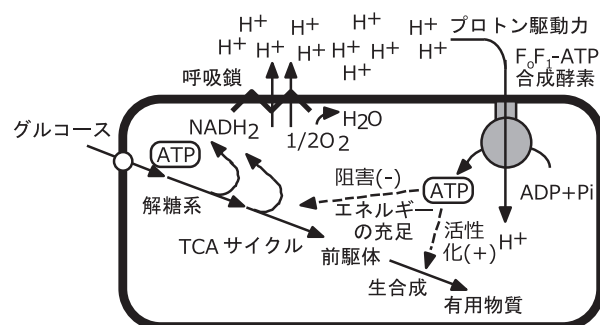


図2. 細菌のエネルギー代謝と中枢代謝の制御。エネルギー充足率が上昇すると、解糖系やTCAサイクルのキーエンザイムがアデニンヌクレオチドやNADHにより活性低下を起こす。したがって、中枢代謝を活性化するにはエネルギー充足率を低下させればよいと予想した。

大腸菌のエネルギー代謝工学

中枢代謝の制御様式 1970年代までの酵素化学的研究から、大腸菌の中枢代謝は解糖系酵素のADPやAMPによる活性化や、ピルビン酸代謝に関わるTCAサイクル酵素のNADHによる阻害など、エネルギー代謝関連物質によりアロステリックに制御されることが示されていた。これらのことから、細胞のエネルギー充足度を低下させること(ADPやAMP濃度の増大、NADH濃度の減少)により、中枢代謝を活性化できるのではないかと予想した(図2)。そのために筆者が取った戦略は、エネルギー獲得の最重要システムである酸化的リン酸化の制御である。酸化的リン酸化は呼吸鎖によるプロトン駆動力の形成と、それを駆動力としたF₀F₁-ATP合成酵素によるATP合成の二段階からなっている(図2)。それぞれのステップをターゲットとして検討した。

F₀F₁-ATP合成酵素欠損株 本酵素の欠損株は基質レベルのリン酸化でしかエネルギーを獲得することができない。このため、著しい生育の低下が予想されたが、実際には解糖活性(基質レベルのリン酸化)の上昇により野生株の60%程度の生育が確保され、ピルビン酸生産菌に応用した場合には、バッチ当たりの発酵所要時間の短縮、ピルビン酸生産収率の大幅な改善が達成された¹⁾。その後、別に構築した単純な本酵素欠損株を連続培養してフラックス解析やアレイ解析などの生理学的基盤解析

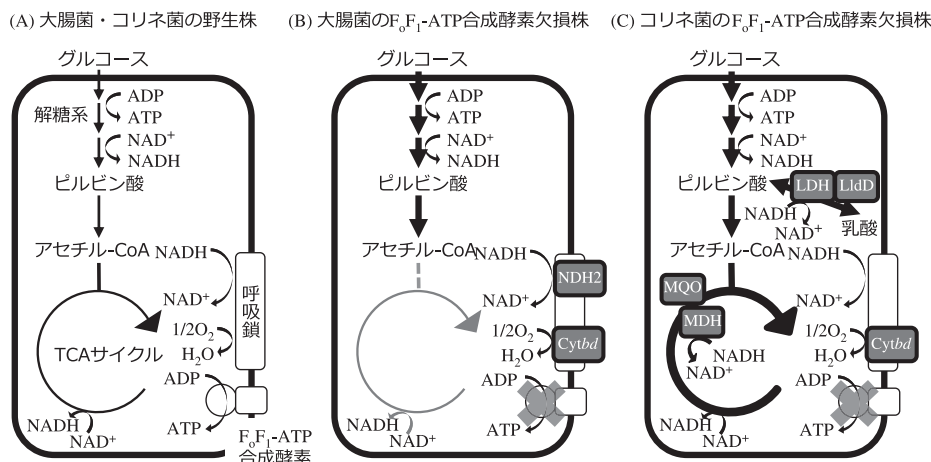


図3. 大腸菌とコリネ型グルタミン酸生産菌のF_oF₁-ATP合成酵素欠損変異株の中核代謝の変化。大腸菌(図B)では、解糖系の流量が増大し、基質レベルのリン酸化によるATP生成が増大したが、TCAサイクル流量の減少がみられた。増大するNADHの再酸化は、呼吸鎖成分NADH脱水素酵素2(NDH2)とシトクロムbd酸化酵素(Cytbd)の発現上昇により呼吸活性を増大することで対応していた。一方、コリネ菌のF_oF₁-ATP合成酵素欠損変異株の場合(図C)は、解糖系流量の増大による基質レベルのリン酸化の増大や、呼吸活性の増大は同様であるが、NADH再酸化の機構が異なっていた。すなわち、呼吸鎖成分はシトクロムbdの増大だけであり、その代わり、TCAサイクルのリンゴ酸とオキサロ酢酸間のシャトル反応を形成するリンゴ酸/キノン酸化還元酵素(MQO)とリンゴ酸脱水素酵素(MDH)の発現上昇によりNADHの再酸化が促進されていた。その他のTCAサイクル酵素の発現量にも増大が見られ、流量も増大していると考えられた。また、ピルビン酸と乳酸間のシャトル反応を形成する2つの乳酸脱水素酵素(LDHとLldD)の発現が上昇し、これもNADHの再酸化の促進に寄与していた。

に注力した。その結果、解糖フラックスの増大、TCAサイクルフラックスの抑制、呼吸活性の上昇、それらを説明する多くの遺伝子発現の変動が観察され(図3B)、これまでまったく知られていなかったエネルギー欠乏ストレスに対する大腸菌の恒常性維持機構が明らかにされた²⁾。

呼吸鎖変異株 一方、プロトン駆動力の形成効率を低下させるような変異を組みあわせて導入した場合には、菌体当たりの糖消費活性が上昇したが、活性上昇はF_oF₁-ATP合成酵素欠損株ほどではなく、バッチ当たりの発酵期間短縮には至らなかった。しかし、呼吸鎖変異導入によるプロトン駆動力形成効率の低下と糖代謝活性の上昇に明瞭な相関が観察されたこと、さらに恒常性維持のための呼吸鎖成分の活性変動や代謝産物の変動についても新知見が得られ、大腸菌のエネルギー代謝と物質生産の新たな理解に貢献した³⁾。

グルタミン酸生産菌のエネルギー代謝工学

本菌のエネルギー代謝に関する知見は乏しかったが、上述の大腸菌の知見から類推し、F_oF₁-ATP合成酵素欠損株を取得したところ、本菌の場合にも糖消費活性や呼吸活性が増大することが見いだされた⁴⁾。その後、本変異の導入によるアミノ酸生産の効率化など、応用面でも有効性を実証した⁵⁾。F_oF₁-ATP合成酵素欠損株の糖代謝

活性上昇機構についてプロテオーム解析を適用して解明を試み、大腸菌とは異なる興味深い変化を見いだした。最大の特徴はTCAサイクル酵素の発現増大であり、なかでも本菌に特徴的なリンゴ酸とオキサロ酢酸間のシャトル反応に共役したNADHの再酸化系の発現上昇が顕著であった⁶⁾。さらにアレイ解析や生化学的解析などを併用し検討したところ、ピルビン酸と乳酸間のシャトル反応に共役したNADHの再酸化系の発現上昇や、呼吸鎖成分の特徴的変動が見いだされた(図3C)⁷⁾。これらの変化は本菌の呼吸活性の上昇を説明するのみならず、本菌のTCAサイクルの頑強性を示している。したがって、本菌が本質的にグルタミン酸やTCAサイクル関連中間体の発酵生産に適していることが明らかにされた。

文 献

- 1) Yokota, A. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2164 (1994).
- 2) Noda, S. et al.: *J. Bacteriol.*, **188**, 6869 (2006).
- 3) Kihira, C. et al.: *J. Biotechnol.*, **158**, 215 (2012).
- 4) Sekine, H. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 534 (2001).
- 5) Aoki, R. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1466 (2005).
- 6) Li, L. et al.: *Proteomics*, **7**, 3348 (2007).
- 7) Sawada, K. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 467 (2012).