

大腸菌のピルビン酸脱水素酵素複合体レギュレーター遺伝子 *pdhR* 欠損変異による中枢代謝の活性化と有用物質生産への応用

横田 篤

北海道大学大学院 農学研究院 生物機能化学分野

研究の目的

化石資源の枯渇，循環型社会の形成などの観点から，微生物を用いた物質発酵生産は，次世代型の物質生産手法として，近年注目されている．このような背景から発酵生産の効率化は重要な課題である．我々は，この課題に対し，中枢代謝の増強という観点からアプローチを試みている．

図 1 に示すように *PdhR* は大腸菌の pyruvate dehydrogenase complex (PDHc) をコードする *pdh* オペロンの転写抑制因子であり，菌体内ピルビン酸濃度上昇に応答して負の転写調節が解除され，ピルビン酸の消費が促進される⁽¹⁾．PDHc は解糖系と TCA サイクルをつなぐ要の酵素であるため，*pdhR* 欠失変異により中枢代謝の活性化が期待される．また，近年 *PdhR* は *pdh* オペロンだけでなく，呼吸鎖酵素である NADH dehydrogenase II (NDH-II) および，cytochrome *bo*₃ oxidase (Cyt *bo*₃)の転写抑制因子として働くことが明らかとなっており⁽²⁾ (図 1)，*pdhR* 欠失変異による中枢代謝の活性化とその物質生産への応用に興味もたれる．そこで $\Delta pdhR$ 株での糖代謝の変化を調べるために，大腸菌の *pdhR* 欠失変異株と野生株の培養特性を比較した．

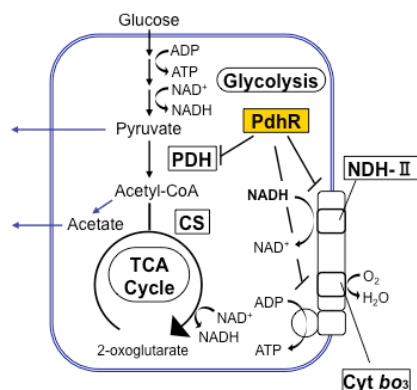


図 1. *PdhR* が制御する中枢代謝および呼吸鎖の諸酵素．

→ : 抑制

方法

野生株 *E. coli* W1485 より Datsenko らの方法⁽³⁾で *pdhR* 欠失変異株 $\Delta pdhR$ を得た．野生株と $\Delta pdhR$ 株について，50 g/L のグルコースを含む無機塩発酵培地を用いて，2-L ジャーファーマンターによるバッチ培養を行った．培養中の溶存酸素濃度 (DO)を一定に保った条件 (STAT 条件，回転数制御により DO>2 ppm に維持)，あるいは DO-STAT 非適用条件 (回転数を固定，対数期後期以降に溶存酸素が枯渇)の二条件で培養を行い，生育，糖消費，呼吸活性，有機酸生成などを比較した．さらに，これらの条件で培養した対数期後期の菌体を用いて，中枢代謝および呼吸鎖において重要な役割を果たす酵素 (PDHc, NDH, Cyt) の活性測定，Cyt 遺伝子の転写量の Real-time PCR 法による解析，細胞内の酸化還元バランスの指標である $NAD^+/NADH$ 比の cycling assay 法による測定を行った．

結果

① $\Delta pdhR$ 株の構築

PCR 解析の結果, $\Delta pdhR$ 株ではゲノム上の $pdhR$ 領域が約 600 bp 欠失しており, $\Delta pdhR$ 株が正しく構築されたことを確認した. また, PDHc および NDH の活性を測定したところ, 既報のとおり両酵素の活性が上昇していることが確認された (③参照).

② 培養特性の比較

$\Delta pdhR$ 株と野生株を 2-L ジャーファーマンターを用いて無機塩発酵培地で培養した. STAT 条件では溶存酸素が枯渇しなかったが, 攪拌速度を 800, 600, 400 rpm に固定した条件では, 攪拌速度の低下に伴い, より短時間で溶存酸素が枯渇した. このことは, 攪拌速度が低下するほど, より酸素供給量が制限されたことを示している.

STAT 条件では $\Delta pdhR$ 株と野生株で同様に良好な生育を示した (図 2 A). 一方, 攪拌速度を 800, 600, 400 rpm に固定した酸素制限条件では生育は低下傾向にあったが, いずれの攪拌速度でも $\Delta pdhR$ 株では野生株よりも高い生育を示した. 図 2 A に示すように特に 600 rpm では差が顕著であり, 野生株は OD₆₆₀ 値が 12 までしか生育しなかったのに対して, $\Delta pdhR$ 株は 20 まで生育した.

糖を全量消費するのに要した時間は, STAT 条件では両株とも 14h 程度であったが, 600 rpm においては野生株が 30h 以上を要したのに対し, $\Delta pdhR$ 株では 24h 程度であった (図 2 B). また, 菌体あたり酸素消費速度 (呼吸活性) はどちらの条件でも, $\Delta pdhR$ 株で野生株の 1.2 倍程度に上昇していた. 従って $\Delta pdhR$ 株では酸素制限条件でより強い代謝活性を発揮できると考えられた.

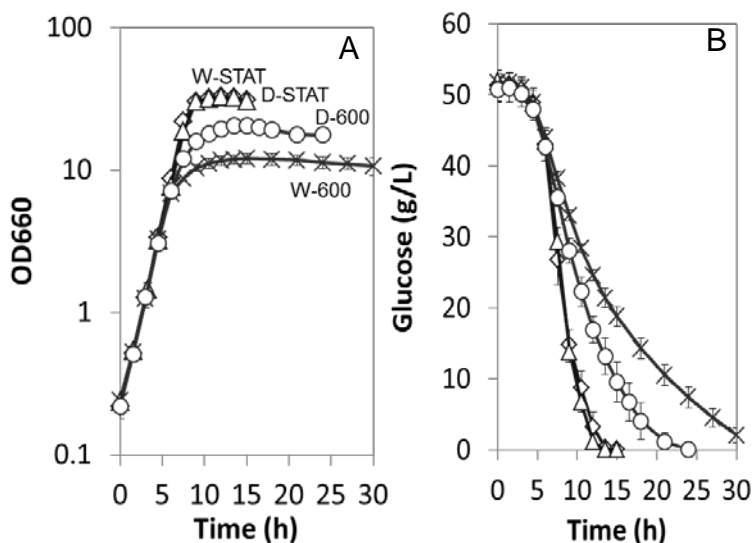


図 2. STAT, 600 rpm 条件における生育と糖消費. 野生株 (W), $\Delta pdhR$ 株 (D). STAT は STAT 条件, 600 は 600 rpm 固定攪拌条件を示す.

有機酸生成について, 培地中の 2-oxoglutarate, pyruvate, acetate 濃度を測定した. STAT 条件では, 両株とも 2 g/L 程度の 2-oxoglutarate を生成し, pyruvate, acetate はほとんど生成されなかった. 一方, 600 rpm 条件では 2-oxoglutarate は野生株よりも $\Delta pdhR$ 株で多く生成し, それぞれ 0.85 g/L, 1.71 g/L であった. Pyruvate は野生株が顕著に生成し, およそ 4 g/L が最大量となったが, $\Delta pdhR$ 株ではほとんど生成されなかった. Acetate は

両株共に生成したが、最大量は野生株が約 10 g/L であるのに対し、 $\Delta pdhR$ 株では約 5 g/L と半分に減少していた。これらの結果は $\Delta pdhR$ 株では炭素の流れが pyruvate 以降も維持され、より多くの炭素が TCA 回路へ流れたためと考えられた。

③ 中枢代謝および呼吸鎖酵素の活性測定

$\Delta pdhR$ 株における代謝変化の機構を明らかにするため、対数増殖期における PDHc, NDH, Cyt の活性を測定した。PDHc 活性は $pdhR$ 欠失により有意に上昇し、STAT 条件で 6.1 倍、600 rpm 条件で 3 倍に上昇していた (図 3)。NDH 活性は、NDH-I 活性と NDH-II 活性に分けて測定した。NDH-I 活性は STAT 条件、600 rpm 条件共に $\Delta pdhR$ 株と野生株の間で差がなかった。一方、NDH-II 活性は STAT 条件において $\Delta pdhR$ 株で野生株の 5.1 倍に上昇、600 rpm 条件において 4.2 倍と大幅に上昇した。大腸菌には 3 種類の Cyt (Cyt bo_3 , Cyt $bd-I$, Cyt $bd-II$) が存在するが、Cyt 活性は 3 種類の酵素活性の合計として測定した。STAT、600 rpm 両条件において、 $\Delta pdhR$ 株と野生株で活性の差はなかった。しかし、両株共に STAT 条件よりも 600 rpm 条件で高い活性を示した。これは $pdhR$ 欠失変異の影響ではなく、嫌気条件に応答するグローバルレギュレーターの影響と考えられた。

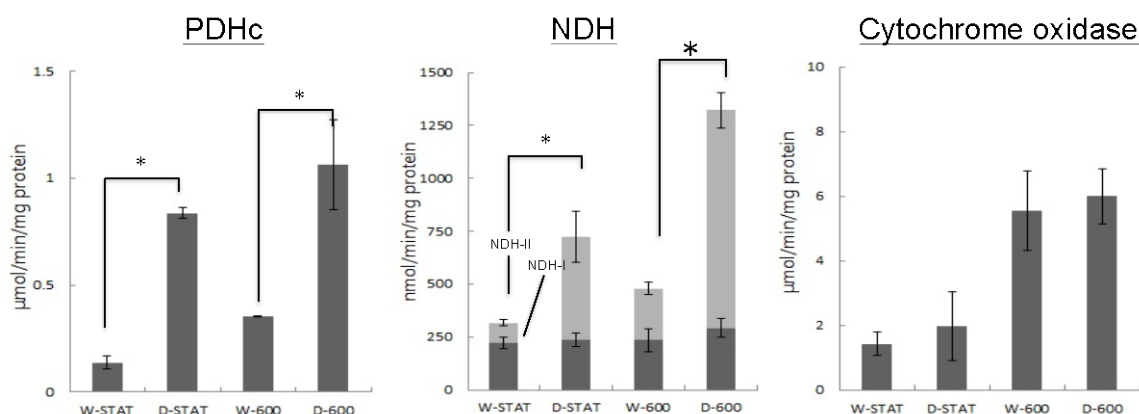


図 3. 中枢代謝および呼吸鎖酵素の活性測定結果。エラーバーは標準偏差(n=3)を、*は $p < 0.05$ で有意差ありを示す。NDH の有意差は NDH-I と NDH-II の合計値について判定した。凡例は図 2 と同様。

④ 末端酸化酵素の転写量解析

酵素活性測定では大腸菌に存在する 3 種類の酵素を測り分けることができない。そこで Real-time PCR 法によりこれらの酵素をコードする遺伝子(*cyo*, *cyd*, *app*)の転写産物量を測定したが、STAT 条件、600 rpm 条件共に $\Delta pdhR$ 株と野生株の間で各遺伝子の転写産物量には差がなかった。したがって、 $pdhR$ が Cyt bo_3 遺伝子発現に与える影響は極めて小さいと考えられた。

⑤ 細胞内 $NAD^+/NADH$ 比の測定

酵素活性測定の結果から $\Delta pdhR$ 株では、PDHc 活性および NDH-II 活性が上昇していることが分かった。これらの酵素は、NADH の生産および消費に参与している。そこで、 $\Delta pdhR$ 株および野生株の細胞内 $NAD^+/NADH$ 比を測定した。その結果、STAT 条件では野生株に対して $\Delta pdhR$ 株の $NAD^+/NADH$ 比は同等から 1.2 倍程度とやや酸化的な状態になっていたのに対し、600 rpm 条件では $\Delta pdhR$ 株の $NAD^+/NADH$ 比は野生株の 0.6 倍程度と有意に低下しており、 $\Delta pdhR$ 株では 600 rpm 条件で細胞内がより還元的な状態になっていると考えられた。

結論

$\Delta pdhR$ 株では酸素供給制限条件において、野生株よりも糖消費活性および生育が高く維持されていた。これは $\Delta pdhR$ 株では炭素がより多量に TCA 回路まで流れ込み、前駆体がスムーズに生成され生育の低下が抑制されたためと考えられた。したがって、本変異により低酸素条件でも代謝活性が持続する省エネ型発酵が可能になると考えられた。

$\Delta pdhR$ 株では大腸菌の通気培養でしばしば問題となる pyruvate や acetate の副生が大幅に抑えられていた。そのメカニズムとして pyruvate の生成が起こらないのは、PDHc 活性上昇の結果と考えられる。したがって、 $\Delta pdhR$ 株では acetyl-CoA 生成量も増加していると考えられるが、その嫌気代謝産物である acetate の生成量は減少し、2-oxoglutarate 生成量が増加した。これは acetyl-CoA によりクエン酸合成酵素が活性化され、よりスムーズに acetyl-CoA が TCA 回路へ流入したためと考えられる。

酵素活性測定の結果、STAT および 600 rpm 両条件において、PdhR 制御下にある PDHc と NDH-II 活性は上昇していたが、Cyt の総活性には差が見られなかった。しかし、呼吸活性は上昇していたことから、呼吸鎖反応では NDH-II 反応が律速となっていると考えられた。実際、NDH の総活性は Cyt の総活性に比べて十分の一程度であり、このことから NDH-II 活性の調節が呼吸活性の調節につながるものと考えられる。

$NAD^+/NADH$ 比測定の結果から、 $\Delta pdhR$ 株の細胞内は酸素制限条件下で野生株よりも還元的な条件になっていた。これは、PDHc 反応の活性化による NADH 供給の増加が原因となり、NDH-II 活性が上昇して呼吸活性が増加したにもかかわらず、NADH の再酸化が追い付いていないためと考えられた。

文献

- (1) Ogasawara, H., Ishida, Y., Yamada, K., Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2007) PdhR (pyruvate dehydrogenase complex regulator) controls the respiratory electron transport system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**:5534-5541.
- (2) Göhler A. K. *et al.* (2011) More than just a metabolic regulator-elucidation and validation of new targets of PdhR in *Escherichia coli*. *BMC Syst. Biol.* **5**:197. doi: 10.1186/1752-0509-5-197.

- (3) Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**:6640-6645.