

コリネ型細菌のアセチル CoA 供給強化に向けた代謝工学と有用物質生産への応用

片岡 尚也
山口大学大学院 創成科学研究科

研究の目的

代表的なコリネ型細菌である *Corynebacterium glutamicum* は、グルタミン酸やリジンといったアミノ酸の工業的発酵生産に用いられている産業微生物である。近年では、本菌の代謝系を操作することでイソブタノールやイタコン酸、カダベリンの効率的生産に関する報告もなされている。しかし、中枢代謝の根幹をなす代謝物の一つであるアセチル CoA を中間代謝物として生成される物質の生産に関する報告例は極めて少ない。本研究では、アセチル CoA の供給・消費に関わる酵素の発現改変を基盤に、アセチル CoA 供給を増大させる因子を明らかにし、合理的に制御することで、*C. glutamicum* でのアセチル CoA を重要中間体とする物質生産の可能性を実証することを最終目的に設定した。

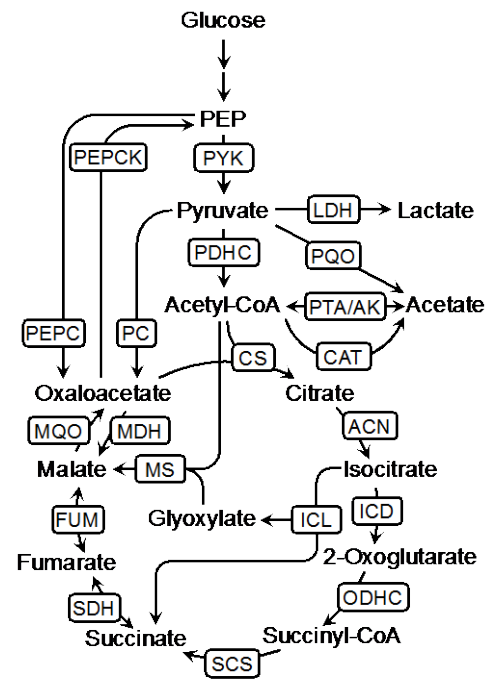


図 1 *C. glutamicum* の中枢代謝

方法

C. glutamicum ATCC 13032 を親株として、各遺伝子 (*ramA*, *ldhA*, *pqo*, *cat*, *pta-ackA*) の欠損は二重相同組換え法によって導入した。各株を 222 mM のグルコースを含む最少培地で 2 L ジャーファーメンターを用いて回分培養し、その発酵特性について解析した。

結果

1. *ramA* 遺伝子の欠損がグルコース代謝に及ぼす影響

アセチル CoA 供給の強化を目指す場合、TCA 回路の回転を減衰させる戦略が有効であると考えられた。*C. glutamicum* の中枢代謝を 図 1 に示す。RamA は、TCA 回路を構成する酵素の内、CS、ACN、ODHC、SCS、SDH、FUM、MQO の発現を正に制御する転写因子で、その欠損株 ($\Delta ramA$) では、上記酵素遺伝子の顕著な転写抑制が確認されていた¹⁾。特に、 $\Delta ramA$ における CS 活性は、野生株の約 10% 程度に低下しており、本研究の目的に合致すると予想された²⁾。そこでまず、 $\Delta ramA$ の糖代謝に

及ぼす影響を評価した。その結果 $\Delta ramA$ は、野生株と比較して、高い糖消費速度、低い生育、高い乳酸・酢酸生成、低いコハク酸・2-オキソグルタル酸蓄積を示した (表 1)。これらは、 $ramA$ の欠損により好気代謝が抑制され、その代わりに発酵を亢進させていることを示しており、目的としていた TCA 回路の回転減衰が $ramA$ の欠損により起こっていたと考えられた。しかし、PDHC 活性を測定したところ、 $\Delta ramA$ で、野生株と比較して顕著な減少が確認された ($4.40 \text{ mU (mg protein)}^{-1}$ vs. $13.5 \text{ mU (mg protein)}^{-1}$)。この結果は、アセチル CoA 供給の強化には負に働くと予想され、目的の達成には、(i) PDHC 活性を維持しつつ $ramA$ に代わり TCA 回路の回転減衰を可能にする新たな因子を探索する、(ii) $ramA$ を生かしつつ PDHC 活性を強化させる、等の軌道修正の必要性が浮上した。

表 1 各株の培養特性; 3 回の独立した培養の結果、生育および代謝産物は最大値、を示す。

Parameter	Wild type	$\Delta ramA$	$\Delta 4$	$\Delta 4 \Delta ramA$
Specific growth rate (h^{-1}) ^a	0.470 ± 0.009	0.443 ± 0.005^c	0.494 ± 0.011^c	0.425 ± 0.009^d
Growth (OD_{600})	27.4 ± 0.7	23.0 ± 0.2^c	27.7 ± 0.5	20.7 ± 0.4^d
Glucose consumption rate ^b	0.957 ± 0.045	1.27 ± 0.04^c	0.913 ± 0.016^c	1.22 ± 0.01^d
Pyruvate (mM)	46.9 ± 3.8	44.2 ± 4.8	89.3 ± 4.0^c	161 ± 4^d
Lactate (mM)	43.8 ± 15.5	103 ± 10^c	4.31 ± 0.26^c	5.87 ± 0.12^d
Acetate (mM)	76.9 ± 10.5	109 ± 4^c	13.5 ± 0.4^c	12.7 ± 0.6
Succinate (mM)	18.5 ± 0.3	13.8 ± 0.2^c	26.6 ± 2.5^c	18.9 ± 0.7^d
2-Oxoglutarate (mM)	5.26 ± 2.75	0.687 ± 0.203^c	4.01 ± 0.03	2.97 ± 0.18^d

^a 対数増殖期 (培養開始後 3-6 時間) の値から算出。

^b 静止期前期 (培養開始後 6-15 時間) の値から算出、単位は糖消費 (mM) (average OD_{600})⁻¹ h^{-1} 。

^c 野生株と比較した時の t 検定 $p < 0.05$ で有意差有りを示す。

^d $\Delta 4$ と比較した時の t 検定 $p < 0.05$ で有意差有りを示す。

2. ピルビン酸高蓄積変異株の作製

目的達成にはいくつかの選択肢が考えられたが、(ii) を基盤に研究を推進することにした。この場合、アセチル CoA の前駆体であるピルビン酸を高蓄積する株を宿主として実験を進めることが望ましい。また、この時点で、PDHC 欠損を伴わないピルビン酸高生産株に関する報告例はなく、“原栄養性ピルビン酸高蓄積 *C. glutamicum* の造成” は、新規性のある課題でもあった³⁾。1. での結果から、 $ramA$ の欠損により、発酵的な代謝を営むことが示されていた。そこで、代表的な発酵産物である乳酸および酢酸の生成に関与する酵素 (LDH、PQO、CAT、PTA/AK; 図 1 参照) をコードする遺伝子 (*ldhA*、*pqo*、*cat*、*pta-ackA*) を欠損した $\Delta 4$ を作製し、 $\Delta 4$ をバックグラウンドにした $ramA$ 欠損の糖代謝に及ぼす影響を評価した (表 1)。その結果、 $\Delta 4$ でも野生株、 $\Delta ramA$ と比較して約 2 倍のピルビン酸を蓄積したが、 $\Delta 4 \Delta ramA$ ではさら

に収量が増加し、その値は $\Delta 4$ の約 1.8 倍 (野生株の 3.4 倍) となった。この値は、原栄養的にピルビン酸を生産する株の報告としては有望であると考えられた。また、この時、乳酸・酢酸を除く代謝産物や糖消費速度、生育は、野生株と $\Delta ramA$ の比較で観察されたものと同様であったため、 $\Delta 4 \Delta ramA$ でも鍵となる TCA 回路の回転減衰は維持されているものと予想された⁵⁾。

結論

本研究では、*C. glutamicum* におけるアセチル CoA 供給を増大させる機構の解析とその物質生産への応用を目的に実験を進めてきた。現時点で、その両方を達成できていないが、足がかりは掴んでいる。*ramA* 欠損は、TCA 回路の回転減衰に有効な変異であるし、アセチル CoA の前駆体であるピルビン酸を原栄養的に高いレベルで供給できる変異株の取得にも成功している。また、 $\Delta ramA$ で見られた PDHC 活性低下の原因の一つとして、RamA が PDHC の E2 サブユニットをコードする *aceF* (以前は *sucB*; ODHC の E2 サブユニットをコードすると考えられていた) の正の転写制御因子でもあることが挙がってきており^{1,4)}、加えて AceF のアミノ酸配列は、*C. glutamicum* 間で特徴的に異なっており、その差の PDHC 活性への影響も示唆されている。今後さらなる解析を加えることで、最終目的の達成に近づいていきたい。

文献

- 1) Auchter, M. *et al.* (2011) RamA and RamB are global transcriptional regulators in *Corynebacterium glutamicum* and control genes for enzymes of the central metabolism. *J. Biotechnol.* **154**: 126-139.
- 2) van Ooyen, J., Emer, D., Bussmann, M., Bott, M., Eikmanns, B.J., and Eggeling, L. (2011) Citrate synthase in *Corynebacterium glutamicum* is encoded by two *gltA* transcripts which are controlled by RamA, RamB, and GlxR. *J. Biotechnol.* **154**: 140-148.
- 3) Wieschalka, S., Blombach, B., and Eikmanns, B.J. (2012) Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 449-459.
- 4) Hoffelder, M., Raasch, K., van Ooyen, J., and Eggeling, L. (2010) The E2 domain of OdhA of *Corynebacterium glutamicum* has succinyltransferase activity dependent on lipoyl residues of the acetyltransferase AceF. *J. Bacteriol.* **192**: 5203-5211.
- 5) Kataoka, N., Vangnai, A.S., Pongtharangkul, T., Yakushi, T., Wada, M., Yokota, A., Matsushita, K. (2019) Engineering of *Corynebacterium glutamicum* as a prototrophic pyruvate-producing strain: Characterization of a *ramA*-deficient mutant and its application for metabolic engineering. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **83**: 372-380.