

令和元年6月18日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07666

研究課題名(和文) 高温性プロピオン酸酸化細菌におけるコハク酸酸化からの水素生成機構の生化学的解明

研究課題名(英文) Elucidation of hydrogen production mechanisms from succinate oxidation in a thermophilic propionate oxidizing bacterium

研究代表者

高坂 智之 (Kosaka, Tomoyuki)

山口大学・大学院創成科学研究科 ・助教

研究者番号：70500453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：プロピオン酸酸化細菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* のプロピオン酸からの水素生成に必要な因子は、膜電位、ATP合成酵素、そしてキノンであることが示された。一方、プロピオン酸代謝経路のコハク酸酸化に関与すると考えられていた二つのコハク酸脱水素酵素は、膜に存在するSDH1が主なコハク酸脱水素酵素であり、細胞質に存在するSDH2はフマル酸還元酵素としての機能が主であることが示唆された。これらのことから、プロピオン酸酸化には膜に存在する酵素群の機能が重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高温メタン発酵ではプロピオン酸などの有機酸が蓄積しやすく、その代謝に重要な因子の探索は高温メタン発酵の安定化につながることを期待される。今回の研究成果によって、中温の場合と同様に高温メタン発酵においてもプロピオン酸酸化には細胞の膜電位が重要であることが示されたことから、メタン発酵槽への微生物の膜電位に影響を及ぼす化学物質の混入やそれらを生産する微生物の増殖がメタン発酵槽の不安定化を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The revealed factors required for hydrogen production from propionate in *Pelotomaculum thermopropionicum* were membrane potential, ATP synthetase, and quinones. On the other hand, the two succinate dehydrogenases found in the genome of *P. thermopropionicum* proposed as responsible for succinate oxidation in the propionate metabolism, of which membrane binding SDH1 was proposed the major succinate dehydrogenase under a propionate oxidizing condition, whereas cytoplasmic SDH2 was predicted as a fumarate reductase under a non-propionate oxidizing condition. These results suggest that protein components localized in membrane responsible for the succinate oxidation are important for the propionate metabolism in *P. thermopropionicum*.

研究分野：応用微生物学

キーワード：共生的プロピオン酸酸化細菌 水素生成 膜電位 メタン発酵 コハク酸脱水素酵素 フマル酸還元酵素 プロピオン酸酸化細菌

1. 研究開始当初の背景

次世代の排水処理技術として期待される高温メタン発酵は、プロピオン酸などの有機酸が蓄積しやすく安定性が低い。そのため、プロピオン酸酸化に関する知見を得ることは微生物制御による発酵の安定化技術のために重要である。しかし、プロピオン酸の酸化分解を担う高温性プロピオン酸酸化細菌のプロピオン酸代謝は、オミックス解析の実施により全体像は明らかとなったが、メカニズムはほとんど不明である。嫌気的な環境で生育するプロピオン酸酸化細菌はその培養の困難さから生化学的な研究がほとんど実施されていない。そこで本研究では、プロピオン酸酸化において水素濃度に最も影響されるコハク酸酸化からの水素生成機構を、高温性プロピオン酸酸化細菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* SI (SI 株) において生化学的に明らかにすることを目的とした。さらには、嫌気環境に生育する微生物特有の代謝機構の解明を目指して、大腸菌を活用した解析系の構築を試みた。この研究の成果によって、高温メタン発酵でのプロピオン酸の酸化分解機構の知見が得られることになり、高温メタン発酵の安定化技術開発に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

プロピオン酸酸化細菌 SI 株におけるコハク酸酸化からの水素生成機構を生化学的に明らかにするために、下記4項目を目的とした。(1) SI 株菌体でプロピオン酸酸化時にコハク酸からの水素生成への膜電位および補因子の関与を明らかにする。(2) ゲノム解析の結果より予測されていた2つのコハク酸脱水素酵素 (SDH) の機能的差異を明らかにする。(3) SDH とヒドロゲナーゼ (HYD) の発現および解析系の構築を試みる。(4) コハク酸酸化から水素までの電子の流れを明らかにする。

3. 研究の方法

プロピオン酸酸化細菌 SI 株においてコハク酸酸化から水素生成への生化学的メカニズムを明らかにするには、反応に必要な酵素と反応を補助する因子を特定し、さらに反応に関わる酵素の機能を明確にする必要がある。そのため、SI 株の細胞を利用する生化学的解析、関係する酵素タンパク質の機能解析、さらには反応に関わる酵素タンパク質の精製と再構成による解析を下記のように行った。(1) SI 株菌体を利用し、プロピオン酸からの水素放出時に様々な試薬を添加することで、水素放出が阻害される条件を探ることにより、必要とされる因子を探索した。さらには培地への補酵素の添加による影響の解析も行った。(2) コハク酸脱水素酵素の部分精製を SI 株細胞を用いて行い、2つの SDH の機能解析を試みた。(3) 大腸菌での異種発現系の構築と酵素活性測定を試みた。(4) SI 株のコハク酸から水素への経路とそれに関わるタンパク質を推定するため、バイオインフォマティクス解析を行った。

4. 研究成果

(1) 研究目的に対する成果

プロピオン酸酸化細菌 SI 株のプロピオン酸からの水素生成に必要な因子を探るため、まず、SI 株をプロピオン酸を基質として培地で保温したところ水素生成が確認された。そこで、この水素生成を阻害する因子を探索したところ、CCCP、DCCD、そして TTFA の添加により阻害されたことから、膜電位、ATP 合成酵素、そしてキノンの水素生成反応への関与が示唆された。一方、培地に対して、補酵素(コバラミン、チアミン、パントテン酸、ピオチン)を培地の10倍量添加し、SI 株のプロピオン酸からの水素生成を観察したが、明確な影響は確認されなかった。

SI 株細胞に存在すると考えられる2つのコハク酸脱水素酵素 SDH1 (膜タイプ) とSDH2 (細胞質タイプ) の特徴解析を行うため、SI 株を単独で培養(基質はフマル酸)した細胞から得た細胞質画分と膜画分のコハク酸脱水素活性を測定した。両画分においてコハク酸酸化活性は確認され、2つの酵素の基質への親和性やpH領域には大きな差は見られなかった。しかし、膜画分の活性が10倍以上高く、そして、膜画分ではキノンの一種である Ubiquinone-1 還元活性が見られたが、細胞質画分ではこの検出が検出されないことがわかった。一方、それぞれの画分の NADH を電子供与体とするコハク酸還元活性を測定したところ、細胞質画分では弱いながらも活性が確認されたが、膜画分では測定することができなかった。これらのことから、SDH1 は膜に存在する主なコハク酸脱水素酵素であり、SDH2 は細胞質に存在しコハク酸酸化活性を有するがフマル酸還元酵素として機能している可能性が示唆された。先の膜電位やキノンのプロピオン酸酸化からの水素生成に必要であることを考慮すると、プロピオン酸酸化時には膜に存在する SDH1 が機能していることが示唆された。

SDH1 および SDH2 のさらなる機能解析のため、それぞれのタンパク質の全サブユニットをコードする遺伝子を大腸菌 SDH と同様のプロモーター下流に連結したプラスミドを構築し大腸菌

に導入したが、SDH 活性は検出されなかった。ただ、SDH1 の A サブユニットのみを発現させたところ、大腸菌で発現が確認された。SDH の補酵素であるフラビンアデニンジヌクレオチドの結合を確認したところ、大腸菌で発現させた SDH1 の A サブユニットへの結合が検出されたことから、補酵素が結合していないことがコハク酸脱水素酵素活性が検出できない理由ではないことが示された。これらの結果から、大腸菌においてSI 株のサブユニット構造を持つ酵素を機能的に発現させるにはさらなる工夫が必要であることが示された。

上記の結果やバイオンフォマティクス解析によって、コハク酸酸化には SDH1 が活躍し、その結果還元されたキノンからの水素生成には HYD4 もしくは HYD1 が関与することを示唆した。

(2) 派生的成果

大腸菌を活用したプロピオン酸酸化細菌 SI 株やそのプロピオン酸酸化時のパートナーであるメタン生成菌の各種遺伝子の機能解析系の構築を試みた。大腸菌のコハク酸脱水素酵素とフマル酸還元酵素の二重破壊株を構築するとともに水素生成酵素である HYD の破壊株を構築し、それぞれの酵素の機能を解析できる大腸菌株を構築した。また、プラスミドの構築系としてギブソンアッセムブリー法を導入し、SDH や HYD の大腸菌での発現プラスミドを複数構築した。このようにして開発した手法を用いて、SI 株のべん毛基底部分にあると考えられる MotABタンパク質の機能解析を試み、大腸菌の *motAB* 破壊株の機能を SI 株の *motAB* が補完できることを、寒天培地上および顕微鏡観察によって確認した（発表論文1）。

ゲノム情報を活用した SDH や HYD のバイオンフォマティクス解析を試み、SDH2 は系統的に類似する微生物よりむしろ共生細菌やメタン生成菌の持つコハク酸脱水素酵素との相溶性が高いことを示唆した。また HYD は複数あるうちの1つの HYD が SDH2 と関与している可能性を示唆した。同様の手法を用いることで、SI 株のプロピオン酸酸化を促進するメタン生成菌 *Methanothermobacter* sp. CaT2 の凝集に関わるタンパク質と類似の構造を持つタンパク質が様々な微生物に存在することを示した（発表論文2）。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

1. Tomoyuki Kosaka, Goda Mutsumi, Manami Inoue, Toshiharu Yakushi, Mamoru Yamada, Flagellum-mediated motility in *Pelotomaculum thermopropionicum* SI, Biosci Biotechnol Biochem, 査読有, 2019, in press

DOI:10.1080/09168451.2019.1597618

2. Kana Sumikawa, Tomoyuki Kosaka, Noriaki Mayahara, Minenosuke Matsutani, Koichi Udo, Mamoru Yamada, An aggregation-defective mutant of *Methanothermobacter* sp. CaT2 reveals unique protein-dependent aggregation, Microbes and Environments, 査読有, 2019, in press

〔学会発表〕（計3件）

津島由佳、石口貴之、高坂智之、山田守：高温性プロピオン酸酸化細菌のプロピオン酸代謝におけるコハク酸脱水素酵素の生理的役割、日本農芸化学会2018年度大会、2018年3月17日(土)、愛知県名古屋市、名城大学天白キャンパス、口頭発表

高坂智之、津島由佳、石口貴之、山田守：プロピオン酸酸化細菌のプロピオン酸酸化からの水素生成に関与する因子の探索、日本農芸化学会2017年度大会、2017年3月19日(日)、京都府京都市、京都女子大、口頭発表

津島由佳、石口貴之、高坂智之、山田守：高温性プロピオン酸酸化細菌のコハク酸酸化に関する酵素の機能的特徴、日本農芸化学会中四国支部第47回講演会(例会)、2017年1月28日(土)、島根県松江市、口頭発表

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

〔その他〕

研究室ホームページ：<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~jo-sei08/index.html>

Research map：<https://researchmap.jp/7000022131>

ORCID：<https://orcid.org/0000-0002-8181-9127>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。