

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14773

研究課題名（和文）核酸代謝の増強が環境ストレスへの対応に及ぼす影響

研究課題名（英文）The effect of reinforcement of nucleic acid metabolism to environmental stress

研究代表者

清 啓自（Kiyoshi, Keiji）

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：80780767

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：Clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4株は37℃では熱ストレスにより芽胞を形成し休眠するが、アデニンの添加により芽胞形成が抑えられ、菌体増殖とブタノール発酵が回復する。TEM観察により37℃では細胞膜が細胞壁から剥離する異常構造が見られたが、アデニン添加でこれが緩和された。一方、アデニンデアミナーゼの破壊によりアデニンの主要代謝経路が明らかになったが、アデニンなしでも耐熱性を獲得し、未知の機能を有する可能性が示唆された。また、アデニンは他種微生物でも細胞増殖において熱ストレスを緩和し、核酸代謝を活用した発酵産業への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

醸造などに用いられる微生物は発酵条件かにおいては、様々なストレスに曝露されている。このようなストレスは発酵を抑制する因子となり得、その因子の解消は発酵効率の向上において重要なものである。本研究では核酸塩基のアデニンの補助によってストレスによって生じる細胞構造の変化を抑制することを示し、細胞外栄養素すなわち培地によって発酵条件のストレス緩和が可能であることを明らかとした。また、乳酸菌の様な食品に用いられる微生物においてもアデニンで耐熱性が向上する傾向がみられたことから、本法の応用によって核酸代謝の変化による発酵効率の向上が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4 forms spores and enters dormancy at 37°C due to heat stress, but the addition of adenine suppresses spore formation, allowing cell growth and butanol fermentation to recover. TEM observation showed that at 37°C, the cell membrane detaches from the cell wall, forming abnormal structures, which were alleviated by adenine addition. On the other hand, the disruption of adenine deaminase clarified the main metabolic pathway of adenine, but even without adenine, heat resistance was acquired, suggesting the presence of unknown functions. Additionally, adenine alleviated heat stress in cell growth in other microorganisms, indicating potential applications of nucleic acid metabolism in the fermentation industry.

研究分野：醸造学

キーワード：ストレス耐性 Clostridium アデニン 芽胞

## 1. 研究開始当初の背景

すべての生物は外部環境から受けるいわゆる外的ストレスに対応しながら生存している。外的ストレスには2種類あり、栄養素や浸透圧、pHの様な溶質に影響される化学的ストレスと、温度や圧力、光などの物理的ストレスが存在する。微生物は物理的ストレスに対して、そのストレス因子を自発的に除去することはできないため、自らの細胞を変化させることでストレス環境に適応している。その変化の多くは外的環境に接触する細胞外縁の細胞膜や細胞壁の構造変化、細胞内部ではシャペロンによるタンパク構造の変化が主であり、ストレスへの適応においてはこれらの分野に研究が集中しているのが実情である。

申請者はこれまでにブタノール発酵性細菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 株 (N1-4 株) を用いて、その発酵可能温度帯の拡大に取り組んでいた。N1-4 株は最適温度が 30°C であるが、37°C では早期に芽胞と呼ばれる胞子を形成することで休眠状態に移行する。このため、高温下では細胞増殖およびブタノール発酵は著しく低下する。これは、N1-4 株にとって 37°C という環境が生存において不適当なため、外的ストレスに強い芽胞を形成し、休眠化することで生存を図るためと推察された。そこで、37°C での培養菌体の細胞内代謝物量を網羅的に解析 (メタボローム解析) したところ、核酸量が低下していることが分かった。このため、細胞内の核酸を補給するために培地へアデニンを添加することで 37°C でも芽胞形成は抑えられ、菌体増殖とブタノール発酵は 30°C と同等にまで回復した。

これはアデニンが細胞外から供給されることによって、*C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 株が 37°C の環境に対してストレス耐性を獲得した、と解釈できた。この現象はアデノシンの様なアデニンを構造に有するものでは同様の効果がみられるが、グアニンやシトシンの様な他の核酸類では全く効果がなかった。また、これまでに微生物での細胞外からの核酸の補助によってストレス環境下でのストレス耐性を獲得したという報告がなく、その作用機序は不明である。このような 20°C~40°C 程度のいわゆる中温域に生息する微生物において、その増殖、発酵での最適温度を決定づける因子が何かは依然として不明であった。

## 2. 研究の目的

核酸は全ての生物に共通する代謝物であり、核酸を用いて合成される DNA は生物の設計図であり、RNA は遺伝子の発現やタンパク質の合成に関与する。さらに核酸を骨格にもつ ATP や NADH などは、生体内の代謝において不可欠な補因子である。核酸は生体内の極めて重要な一次代謝物の1つであるが、菌体が過酷な外的ストレスに対して暴露されたとき、その生合成の変化や代謝物量がどのような挙動を示しているのかの報告は少ない。

そのため、本研究では、微生物のストレス環境下での特定代謝物 (主に核酸) の細胞外からの補強および生合成の強化によって、微生物の種類を問わずストレス耐性を付与できるかを追求した。また、*Clostridium* 属細菌のように芽胞形成性の微生物は、同属においても種が異なればその芽胞形成の形成機構が異なることが分かっている。N1-4 株が属する *C. saccharoperbutylacetonicum* においては、芽胞形成機構に関する報告は極めて少なく、その遺伝子制御機構なども不透明であった。そのため、核酸による芽胞形成の抑制効果を活用した *C. saccharoperbutylacetonicum* の芽胞形成機構も合わせて解明を進めた。

## 3. 研究の方法

アデニン添加による芽胞形成の変化を、共同研究者である中山俊一准教授のもとで取得された芽胞形成に関連する可能性のある遺伝子破壊株と野生株を用いて、遺伝子転写の測定と電子顕微鏡を用いた細胞形状を観察し、各遺伝子と芽胞形成の関連性とその影響を精査した。

アデニン代謝関連の遺伝子群において遺伝子破壊株を獲得し、破壊株におけるアデニン添加時の芽胞形成と発酵能の変化を観察し、アデニン代謝と芽胞形成の関連性を解析した。

他種発酵性の微生物としてグラム陽性細菌に乳酸菌、グラム陰性細菌に酢酸菌、真核生物に酵母からそれぞれ代表菌種複数株を用いて、アデニンにより熱ストレス耐性が付与されるかを検討した。

## 4. 研究成果

野生株を用いた TEM (透過型電子顕微鏡) を用いて、37°C の芽胞形成が促進される温度において、30°C では見られない細胞膜が細胞壁から剥離し隙間が生じるような異常構造が観察され

た。これは細胞分裂あるいは内生芽胞形成時の括れ構造の形成異常に起因している可能性が高く、熱以外の他種ストレス（塩、pH、酸素）ではこれらの構造は観察できなかった。熱ストレスにおいては芽胞形成がみられるものの、この芽胞には発芽能力が確認できておらず芽胞形成が未成熟な状態でとどまっていることが推察されていた。このため、この芽胞形成過程における異常構造の発生が熱ストレスにおける芽胞の未成熟化の一因であることが示唆された。また、37°C培養の細胞における細胞膜が細胞壁から剥離するような異常構造は、アデニン存在下で緩和される傾向が見られ、この異常構造は熱ストレスで発生する芽胞形成に関与している可能性が考えられた。

また、N1-4株で報告されている芽胞形成およびブタノール生産のレギュレータである *spo0A* 遺伝子の破壊株では、TEM 観察により細胞壁構造の肥厚化が確認された。*Spo0A* 破壊株では初期芽胞形成は見られるものの、他の芽胞形成関連遺伝子群の破壊株と異なりブタノール形成能が欠失していた。このため、異常代謝の状態が細胞へのダメージとなり、細胞壁の肥厚化につながっていると考えられた。

一方、アデニン代謝関連遺伝子のアデニンデアミナーゼ破壊株で細胞外のアデニンの代謝能を欠失した。このため、脱アミノによるヒポキサンチンを生成するアデニンの一般的な salvage 経路が N1-4株のアデニン代謝の主要代謝経路であると明らかになった。このため、 $\Delta ade$  株ではアデニン添加による耐熱性の獲得も欠失すると予期されたが、予想に反し  $\Delta ade$  株ではアデニン無添加でも 37°C培養において野生株のアデニン添加条件と同様の耐熱性を有していた。また、N1-4株のアデニンデアミナーゼの過剰発現用プラスミドを構築し大腸菌において過剰発現したところ、LB 培地の様な富栄養条件下でコントロールよりも高い細胞増殖を示した。このため、N1-4株自体のアデニンデアミナーゼは未知の機能を有する可能性が高い。

アデニンにおけるストレス付加効果をグラム陽性細菌（乳酸菌）において、アデニン添加による細胞増殖回復傾向が見られたが、発酵能の改善は見られなかった。これにより、グラム陽性細菌においてアデニンが熱ストレス条件下の細胞壁合成系に寄与し、ストレスによる細胞異常を緩和している可能性が示唆された。

以上をまとめると、N1-4株を用いた *C. saccharoperbutylacetonicum* の芽胞形成において熱ストレスは他ストレスと異なったストレス応答機構を有し、熱により誘導される芽胞の未熟化が生じていることが明らかになった。アデニンはこの異常構造の形成を緩和し、これが細胞外アデニンによる耐熱性の付与効果の一因であると考えられる。また、アデニンは他種微生物においてもストレス下での増殖能を回復する効果がみられており、この解析を進めることで核酸代謝を活用した対ストレス耐性微生物の獲得と発酵産業への応用が可能と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuhiko Furuya, Keiji Kiyoshi, Chaophaya Punjuy, Naoto Yoshida, Risa Maruyama, Tatsuki Yasuda, Kota Watanabe, Toshimori Kadokura, Shunichi Nakayama	4. 巻 136
2. 論文標題 Effect of spo0A, sigE, sigG, and sigK disruption on butanol production and spore formation in <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> strain N1-4 (ATCC13564)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 198-204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2023.07.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Chaophaya Panjuy, Kuzahiko Furuya, Naoto Yoshida, Shunichi Nakayama, Keiji Kiyoshi
2. 発表標題 Effect of regulator gene and environmental stimulation on <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> strain N1-4 spore porphology.
3. 学会等名 第28回日本生物工学会九州支部佐賀大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中山 俊一  (Nakayama Shunichi)	東京農業大学・応用生物化学部・准教授  (32658)	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4株の遺伝子破壊株の提供

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------