

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：34428

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14893

研究課題名(和文)好アルカリ性細菌の原形質分離をプロトン駆動力形成基盤とした革新的ATP合成機構

研究課題名(英文) Novel and innovative mechanism of ATP biosynthesis based on the plasmolysis as a proton-driven force in alkalophilic bacteria

研究代表者

村田 幸作 (Murata, Kousaku)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：90142299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：好アルカリ性細菌は、プロトン(H⁺)駆動力に依存した膜酵素(F₀F₁-ATPase)によってATPを合成するとされるが、H⁺駆動力形成に関する明確な証左はなく、その詳細は不明である。アルカリ性細菌である土壌由来グラム陰性細菌(Aeromonas sp. L株)のアルカリ環境(pH9以上)に於けるATP合成機構を解析し、原形質分離による細胞膜の物理化学的収縮・膨張をプロトンの蓄積・駆動力とする斬新なATP合成機構の存在を示唆した。また、好アルカリ性Aeromonas sp. L株を廃グリセロールの利活用に応用し、多様な有機酸の生産を可能にした。

研究成果の概要(英文)：It has been postulated that alkalophilic bacteria synthesize ATP by the action of membrane-bound F₀F₁-ATPase, thereby utilizing proton (H⁺) chemical gradient formed across the cytoplasmic membrane as an energy source. However, in alkaline growth conditions, it seems difficult to accumulate H⁺ outside the membrane, since H⁺ is readily converted to H₂O through the reaction with OH⁻ present in external milieu at extremely high concentration. We found that the cells of Aeromonas sp. strain L, a Gram negative rod, repeat plasmolysis in accordance with cell growth (i.e. cell division) and postulated the possibility that the physicochemical structures induced during a contraction and expansion of cytoplasmic membrane will prepare place for H⁺ accumulation and form chemical gradient of H⁺ across the cell membrane. This physicochemical mechanism for the ATP synthesis will be expected to exclude the unclear hitherto explanation as to the ATP synthesis in alkalophilic bacteria.

研究分野：応用微生物学

キーワード：好アルカリ性細菌 原形質分離 ATP合成機構 プロトン勾配 細菌内膜動的構造

1. 研究開始当初の背景

本研究は、好アルカリ性細菌のエネルギー(ATP)獲得機構の解明を目的とする。ポリビニルアルコール(PVA)分解菌として土壌から分離されたグラム陰性のエロモナス属細菌 L 株 (*Aeromonas* sp. Strain L)は、pH11 近辺に増殖至適 pH を持つ。pH 7 では殆ど増殖しない。

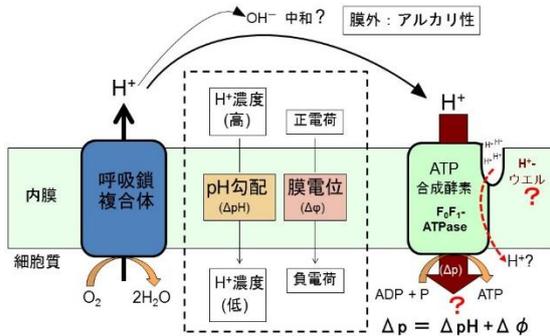


図 1. H⁺駆動力形成機構: H⁺ウエル仮説

グラム陽性細菌内膜に於ける H⁺駆動力形成機構として、呼吸鎖から排出された H⁺は H⁺ウエル(仮定)に貯蔵され、そこから拡散により F₀F₁-ATPase に供給されるとする。

好アルカリ性細菌は、プロトン(H⁺)駆動力に依存した膜酵素(F₀F₁-ATPase)によって ATP を合成するとされるが、H⁺駆動力形成に関する明確な証左はなく、その詳細は不明である。L 株は、アルカリ環境(pH9 以上)に於いて強い原形質分離を起こし、その細胞質はリボゾームを高密度に含むゾル状態を呈する。

2. 研究の目的

そこで、細胞質の膨張と収縮のメカノケミカル過程(内膜伸縮による「皺構造」の形成)が、H⁺駆動力を生み出す直接的な要因であると考え、H⁺や Na⁺の膜内外への移動を内膜伸縮との関連から解析することにより、アルカリ環境での斬新な ATP 合成機構の提唱を目指した。この研究過程で垣間見られた L 株の特異な生存戦略機構の様相、並びにバイオディーゼル生産過程で生じるアルカリ性「廃グリセロール」の資源化への L 株の適用についても言及した。

3. 研究の方法

ポリビニルアルコール(PVA:ケン化率 86.5 ~89%, 重合度約 500)分解細菌として土壌より分離したエロモナス属細菌 L 株 (*Aeromonas* sp. Strain L)は、1.0%PVA(または、0.5%グルコース), 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.3% K₂HPO₄, 0.1% NaCl, 0.01% MgSO₄, 0.0001% FeSO₄を含む培地(pH11, 30ml/100ml 三角フラスコ)を用いて、30°C、振とうにより培養した。細胞は瞬間凍結法(Rapid Freezing 法)で固定し、電子顕微鏡観察に供した。廃グリセロールの資源化も本研究の目的であるが、それに関する方法は省略した。

4. 研究成果

(1)好アルカリ性細菌のエネルギー獲得機構

①皺構造(wrinkle pocket)仮説

好アルカリ性細菌は、酸化リン酸化経路(呼吸鎖)によって H⁺を細胞外に排出して H⁺駆動力を生み出し、細胞膜内 F₀F₁-ATPase によって ATP を合成するとされる(図 1)。しかしながら、好アルカリ性細菌の細胞質 pH は、外界の pH より 2 程度低いため、H⁺が細胞外へ向かう勾配となる。実際、本研究でも採用する条件であるが、細胞外 pH が 11 付近では、H⁺濃

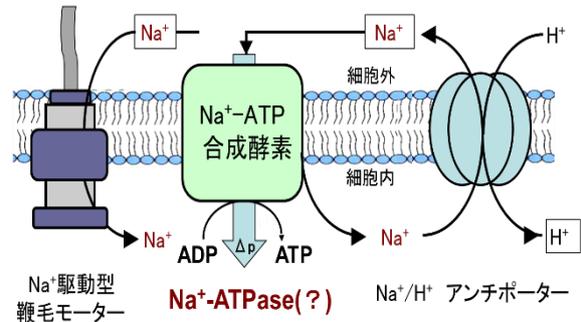


図 2. Na⁺/H⁺-アンチポーター

度は 10⁻¹¹M と極めて薄く、H⁺がエネルギーを要する浸透圧的(栄養素輸送)、機械的(鞭毛モーター)、化学的(ATP 合成)仕事の共役イオンになること、つまり、細胞内に向かう H⁺駆動力になることは困難な状況にある。そのためか、好アルカリ性細菌は、上記仕事の共役イオンに Na⁺を用い、その場合の Na⁺濃度勾配の形成には、膜電位によって駆動される Na⁺/H⁺アンチポーターが関与する(図 2)。つまり、好アルカリ性細菌は、アルカリ側で不利となる共役イオンとしての H⁺を Na⁺に置換してこの困難を克服していると想定される。しかし、ATP 合成に必要な Na⁺を共役イオンとする F₀F₁-ATPase の存在は、極めて限定的である(図 2)。

こうした、アルカリ環境に於ける ATP 合成の難点を回避するため、呼吸鎖によって排出された H⁺は膜局所(ウエル)に蓄積され、膜内拡散によって直接 F₀F₁-ATPase に渡されて ATP 合成に利用されるとする H⁺ウエル仮説(図 1)が提唱されている(1)。しかし、この仮説は、

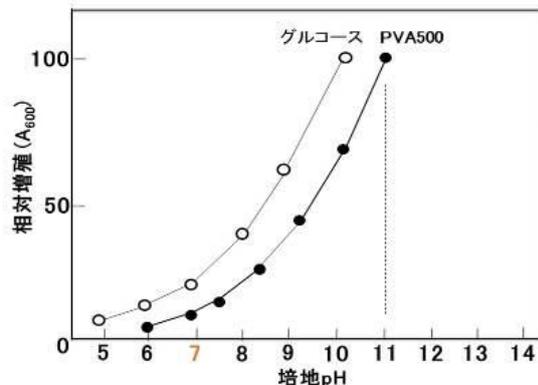


図 3. L 株の最適増殖 pH

炭素源: ○, グルコース; ●, PVA

細胞膜内(または表面)に H⁺を保持する物質的、構造的根拠を欠き(2)、しかも、これは、基本的にはグラム陽性細菌に適用される推論でしかない。

H⁺ウエル仮説以外にも、細胞膜外での H⁺濃度を高める機構として、二次的な細胞壁局在酸性糖鎖の存在も指摘されているが (3)、その H⁺駆動力形成への寄与には計り難いものがある。また、グラム陽性・好アルカリ性細菌の細胞膜には、電子伝達系のシトクローム (Cyt) が通常の細菌の数倍存在することも報告 (4) されているが、それによって細胞外 H⁺濃度が増大し、細胞内に向かう H⁺駆動力が形成されることを示す実験的証左はない。しかも、好アルカリ性細菌に於ける F₀F₁-ATPase による ATP 合成機構の解析は、主にグラム陽性細菌について行われており、本研究で対象とするグラム陰性細菌に関する知見は乏しい。

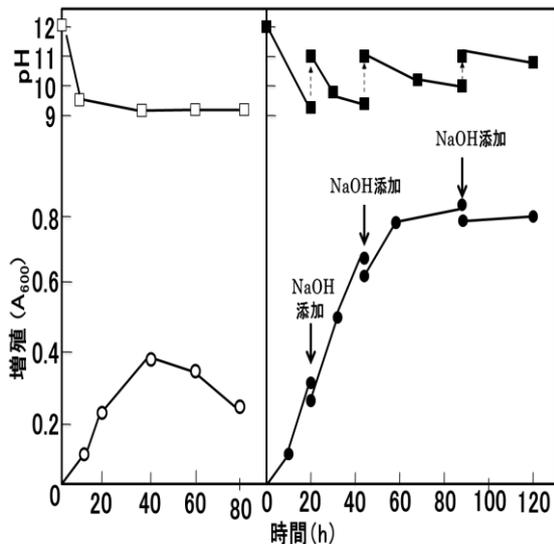


図 4. L 株の増殖に及ぼす pH 調整効果

初発 pH12 (pH11.5 以上は不安定) で培養開始後、pH 未調整の場合 (左) と pH 調整の場合 (右) での増殖を示す。矢印の時点で、5M NaOH で pH11 に調整。炭素源: 1.0% PVA

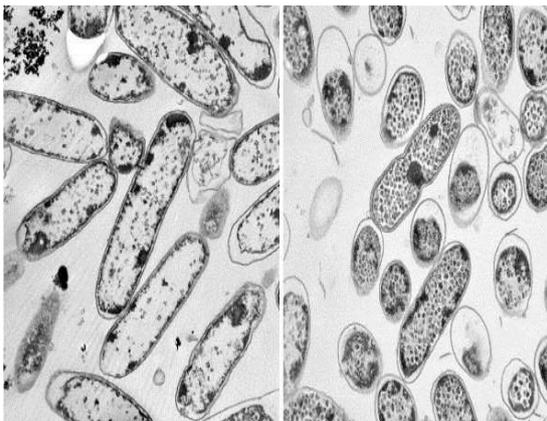


図 5. 強アルカリ培地での L 株の原形質分離

グルコースを含む最少培地に L 株を増殖 (30 時間: 定常期初期) させた場合の細胞切片像。左、pH7.0; 右、pH11.0

グラム陰性・鞭毛形成性の土壌由来細菌 L 株は、極めて強いアルカリ耐性を有し、その増殖至適 pH は 11 近辺にある (図 3)。PVA (グルコースでも同様) を炭素源とした pH11 での培養に於いては、増殖と共に培地 pH が低下し、

増殖も緩慢になるが、pH を 11 に調整することによって L 株は正常な増殖を取り戻す (図 4 右)。更に、アルカリ環境に於いて L 株が示す顕著な特性は、pH10 以上では (pH7 の場合に比べて) 細胞質は高密度にリボソームを蓄えた旺盛なタンパク質合成状況にありながらも、細胞は極端な原形質分離を起こすことにある (図 5 右)。

これらの結果から、L 株は、強アルカリ環境に於いて内膜の伸縮、つまり原形質分離を繰り返し、H⁺や Na⁺の濃度勾配形成を可能にしていると考えられる。そこで、H⁺ウエル仮説 (図 1) とは別に、内膜の伸縮による原形質分離の反復過程こそが、H⁺勾配形成の真の原動力であり、これが F₀F₁-ATPase 反応に共役すると云う新たな説を提唱した。つまり、内膜の伸縮により形成される内膜の凹凸構造「皺構造 (wrinkle pocket)」こそが、呼吸鎖から排出された H⁺の受け皿“ポケット”であり、同時にこの「皺構造 (wrinkle pocket)」が、呼吸鎖の F₀F₁-ATPase 反応部位への空間的近接を可能にすると想定した。ここに、本研究の挑戦性と斬新性・革新性がある。

②アルカリ耐性と浸透圧感受性

L 株は、pH11 近辺の強アルカリ環境下に於いて、原形質分離を繰り返しつつ増殖をされると考えられる。その場合の細胞死は、濁度増加 (図 4) から否定される。そこで、好アルカリ性と原形質分離との相関、つまり、強アルカ

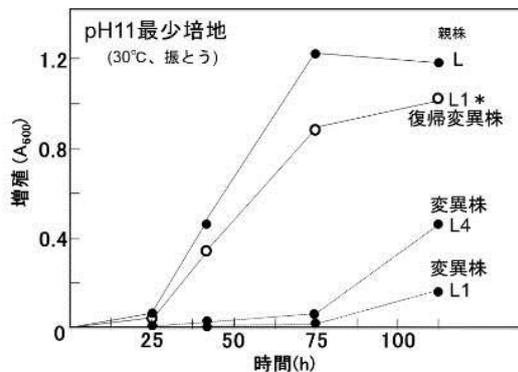


図 6. 低増殖性変異株の増殖

L 株 (●実線)、変異株 L1, L4 (●点線)、復帰変異株 L1* (○点線) 炭素源: PVA

リ環境下での内膜局在性 F₀F₁-ATPase による ATP 合成のための H⁺駆動力形成と内膜伸縮 (原形質分離の反復) との関連を、細胞の浸透圧感受性から判断した (表 1)。L 株から変異誘導した好アルカリ性・低増殖性変異株 L1 や L4 (図 6: 両株は、pH10 以上の寒天プレート上で小コロニーを形成する) は、同時に浸透圧耐性 (スクロース 0.6M 存在下で増殖可能) を獲得していることを見出した。また、L1 株の復帰変異株 L1* は、L 株と同様に増殖し (図 6)、且つ L 株と同レベルの浸透圧感受性 (スクロース 0.4M 以下で PVA に増殖可能) となっていることが確認された。つまり、好アルカリ性の L 株は原形質分離を繰り返すため、その過程で浸透圧に不安定な一過性の状態を経る

が、変異株 L1 や L4 は、原形質分離を起こさないため浸透圧耐性を示すと考えられる。換言すると、変異株 L1 や L4 は、内膜伸縮を生じないため H⁺駆動力を産み出す H⁺貯蔵構造を形成することが出来ず、そのため ATP 合成能が低下し、アルカリ寒天プレート上で小コロニーを示すことになる。復帰変異株 L1(*)は、原形質分離能を再獲得したと考えられる。しかし、L 株、L1 株、及び L1(*) 株に於ける原形質分離と増殖(ATP 生成能)との関連の解析は、L 株の極端な細胞形態の変化により困難を来した(図 8, 9)。

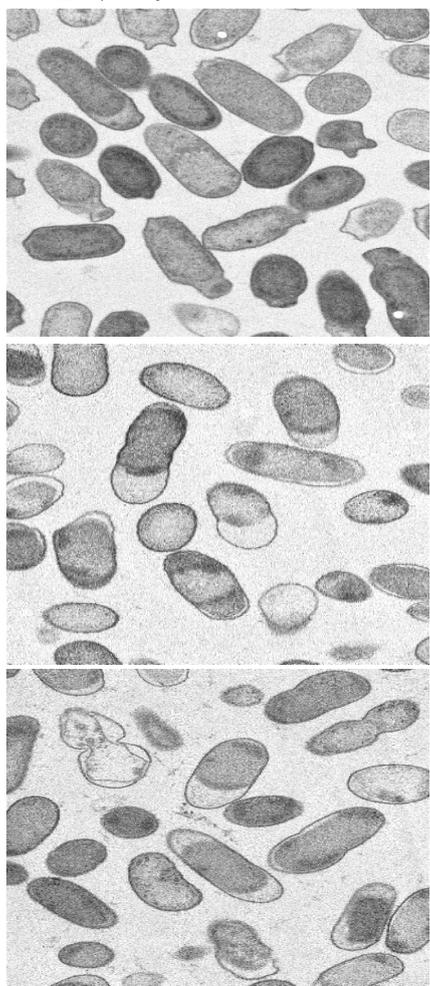


図 7. pH 調製による原形質分離の再開
pH7 培地では、pH 低下により増殖が鈍化する。この細胞に原形質分離は見られない(上)。この培地の pH を pH9.0 (中)と pH11 (下) にジャンプさせると増殖が旺盛になり、且つ原形質分離が観察されるようになる。図中の番号は、実験写真番号(以下同様)。

③アルカリ耐性と原形質分離

本研究の最も重要な点は、原形質分離がエネルギー(ATP)生成と関連しているか否か(つまり、増殖と連関しているか否か)の検証にある。先に、培地の pH を 11 に維持するとアルカリ環境での増殖が正常になることを示した(図 4)。この場合、増殖細胞が原形質分離を回復しているかどうか調べた(図 7)。先述したように、PVA を炭素源として培養すると、最初は

良好に増殖するが、培地の pH 低下と共に増殖は鈍化する(図 4 左)。そこで、培地の pH を 7 に維持して培養を続けた。pH7 に調整しても大幅な増殖は認められないことを確認してから、培地 pH を 9 と 11 にジャンプさせた[注：PVA を炭素源として(且つ、pH を調整して)培養した場合(図 7 上)には、グルコースを炭素源として(且つ、pH を調整せずに)培養した場合(図 5 左)に比べて、細胞の極端な空疎化は認められ

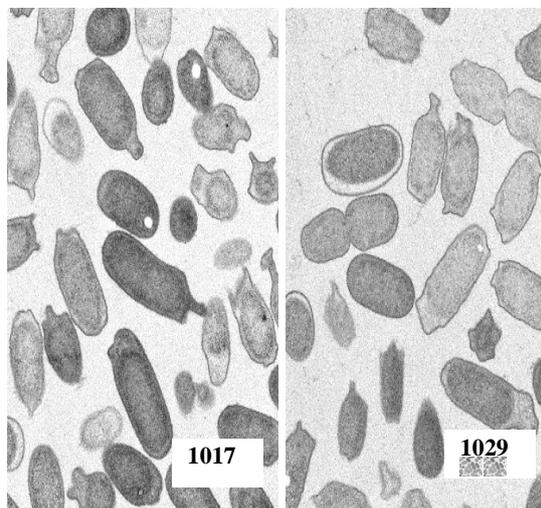


図 8. 異形細胞

pH7 での培養後期(炭素源：PVA)には多くの異型細胞が出現する。

なかった。ただ、PVA の場合には、異型細胞の出現が生じた(図 8)。このことに関しては、後述する]。pH7→pH9 へのジャンプにより、細胞は明瞭な原形質分離を起こし(図 7 中)、増殖も向上した(データ省略)。同様に、pH7→pH11 へのジャンプでも原形質分離が認められたが(図 7 下)、余りに極端な環境変化のためか、若干、予想外の現象も生じた(図 9)。

これら pH ジャンプに関する結果は、少なくとも、増殖が原形質分離に依存していること、つまり、グラム陰性・好アルカリ性細菌に於いては、増殖のエネルギーが原形質分離の反復運動で供給されていることを示唆するものであり、H⁺駆動力の形成が、従来の細胞骨格の変動を伴わない静的過程ではなく、内膜の伸縮(原形質分離の反復)を伴う動的なメカノケミカル過程によると云う新たな概念の確立(本研究の目的)に繋がる。原形質分離(及び、それに付随する原形質流動)を、エネルギー生産の機械的装置の概念で捉えた研究は例を見ず、細胞エネルギー論の新たな地平を切り拓くことが期待される。そのためには、原形質分離の機構と機能、特にそのエネルギー生産の生物学的意義の理解が必要であり、アルカリ環境での細胞内構造を正確に固定し、内膜と外膜の超微細構造と機能の解析が求められる。また、変異株 L1 や L4 の変異を相補する遺伝子の解析も、膜運動を分子レベルで理解することを可能にすると考えられる。

④生存戦略と原形質分離

しかしながら、アルカリ環境での細胞内構造の解析は、L株が異常な細胞形態をとることから容易ではないと判断された。L株は、pH7培地(炭素源:PVA)で増殖が停止した以降も培養を続けると、極めて多様な形態の細胞に変化した(図8)。この現象は、既に定常期後期から始まっているかに見える(図7上)。これは、pH7で培養を行なった場合にのみ見られる現象であり、pH9以上の培地(例えば、図9)では認められない。この事実も、L株がアルカリ環境を好む細菌であることを支持しているのかも知れない。ただ、pH11では異型細胞は出現しないが、不自然な細胞間相互作用(細胞間接着)が生起するようになる(図9)。それは、

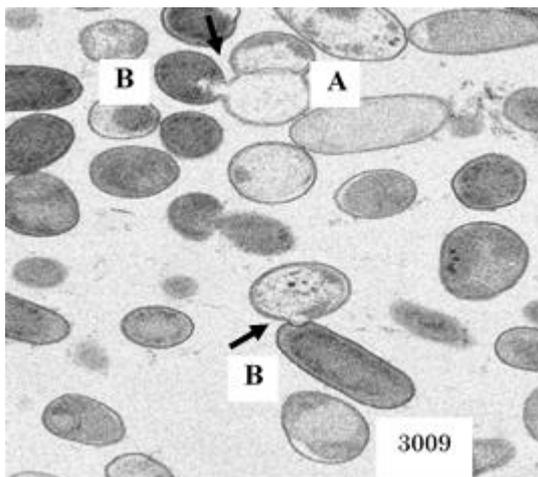


図9. 捕食と捕食者, 細胞絶滅回避

→: 被捕食者Aと捕食者Bの接着。pH11での増殖(炭素源:PVA)において、A細胞の細胞質はB細胞に吸い取られ、空疎になる。

L株同士が“共食い”をするかのような現象である(図9)。つまり、pH9以上の培養後期の培地には、原形質分離を起こしている細胞と共に、細胞内リボソーム密度の高い細胞と細胞内が空疎な細胞が共存し、前者は、後者の細胞質を“吸い取る”ことによって延命を図っているとも考えられる。この細胞間相互作用において、捕食者と被捕食者のどちらかに原形質分離の状況が作り出されていることも想定される(つまり、原形質分離が細胞間接着を促している側面も想定される)。L株細胞は、増殖した後、栄養源などの枯渇、或いはpHなどの物理化学的な環境悪化により増殖を停止し、死に至るが、全滅を回避するため多くの細胞の犠牲(生贄)の上に少数の存続を図る戦略を取っているのかも知れない。重要な問題である。

(2)好アルカリ性細菌による廃グリセロールの資源化

バイオディーゼル燃料(BDF)は、軽油の代替燃料として用いられる環境調和型のバイオマス液体燃料である。世界のBDF製造量は年々増えており、2016年における製造量は308億リットルと見積もられている(5)。この

BDF製造過程で、グリセロール(廃グリセロール)が原料油脂の10~20%程度副生する(6,7)。廃グリセロールはアルカリ性であることに加えて、脂肪酸やメタノールなどの不純物を多く含む。しかし、グリセロールはバイ

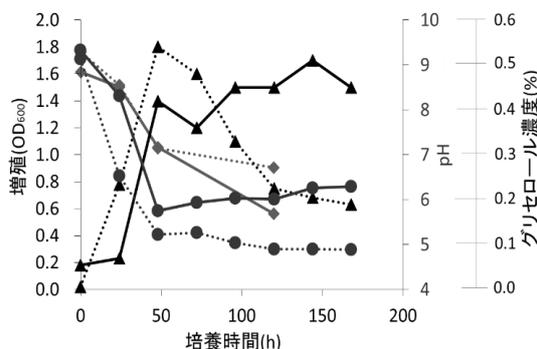


図10. 廃グリセロールおよび脱油廃グリセロール培地におけるL株の培養

実線: 廃グリセロール, 破線: 脱油廃グリセロール。▲: 増殖(OD₆₀₀), ●: 培地のpH, ◆: グリセロール濃度

オリファイナリー社会への転換の基幹物質であるため、その利活用法を開発することも重要である(8,9)。「廃グリセロール」は、高アルカリ性溶液であるため、その処理にはL株のような好アルカリ性細菌が適する。そこで、L株を用いて廃グリセロールの再資源化の可能性を検討した。

京都市の廃食用油燃料化施設より提供された廃グリセロールは、約50%グリセロール、25%脂肪酸、15%メタノールを含み、10倍希釈液のpHは10.5を示す。この廃グリセロールから、油分を除去した脱油廃グリセロールを調製した(方法:省略)。本菌は、廃グリセロールと脱油廃グリセロールのどちらをも炭素源として良好に増殖し(10)(図10)、酢酸、乳酸などの有機酸を生産した(10)(図11)。また、廃グリセロール中のグリセロールは、主にグリセロール3-リン酸を通る経路で代謝されることも明らかにした(10)。

(3)展望

土壌由来のグラム陰性・好アルカリ性のL株(*Aeromonas* sp. Strain L)は、多様な細胞形態を取るが故に、アルカリ環境におけるATP

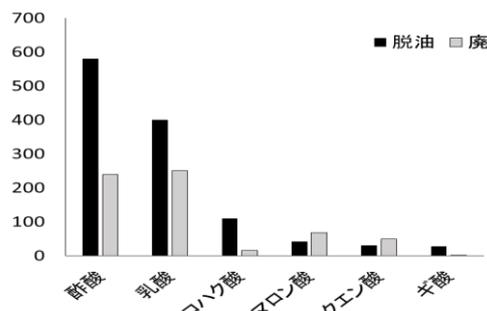


図11. L株の培養上清における有機酸の濃度

30℃、5日間、120spmで振とう培養したときの培養上清中の有機酸をHPLC法で定量した。黒: 脱油グリセロール培地、灰: 廃グリセロール培地。

生成機構の解析に適した細菌であるとは言えない側面もあるが、内膜と外膜の間に存在する空間(ペリプラズム空間)の生物学的機能、特に内膜の振動によって生じるであろう物理化学的な機能の理解に有用である。本挑戦的萌芽研究では決着をつけることが出来なかったが、ペリプラズム空間を自在に操った内膜運動が ATP 生成に深く関わっていることを示唆することが出来た点は大きな成果である。

この基本線に沿って、細菌の Bioenergetics が進展することを期待する。尚、廃グリセロールの資源化に関する研究は、L 株と同様にアルカリ側に増殖至適 pH をもつ窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* でも検討し、多くの、且つ、詳細な成果を挙げることができた(10)。詳細は省略するが、本細菌 *A. vinelandii* により、廃グリセロールから多糖アルギン酸やプラスチック (PHB:ポリヒドロキシ酪酸) の生産が可能になるであろう(10)。

参考文献

1. Mulkidjanian, A. Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 415-427 (2006).
2. Cherepanov, D. A. *et al.*, *Biophys. J.*, **85**, 1307 (2003).
3. Aono, R. *et al.*, *Microbiology*, **141**, 2955 (1995).
4. Yumoto, I., *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 342-353 (2002).
5. REN21 Renewables Global Status Report (2017). <http://www.ren21.net/>
6. Vicente, G. *et al.*, *Bioresour. Technol.*, **92**, 297-305 (2004).
7. Du, W. *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **38**, 103-106 (2004).
8. Clomburg, J. M. *et al.*, *Trends Biotechnol.*, **31**, 20-28 (2013).
9. Dobson, R. *et al.*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 217-226 (2012).
10. Maruyama, Y., アサヒグループ学術振興財団 研究紀要 (印刷中) (2018).

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 代表研究者

村田 幸作 (Murata, Kousaku)
摂南大学・理工学部・教授
研究者番号：90142299

(2) 研究分担者

橋本 渉 (Hashimoto, Wataru)
京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授
研究者番号：30273519

丸山 如江 (Maruyama, Yukie)
摂南大学・理工学部・助教
研究者番号：90397563