

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05174

研究課題名（和文）浪費回路の制御を介した微生物の熱エネルギー変換効率の制御

研究課題名（英文）Control of microbial thermal energy conversion efficiency through regulation of futile pathways

研究代表者

田畠 健治 (Tabata, Kenji)

第一薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80312263

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：バイオマス生産を伴わないエネルギー消費である浪費回路の制御は、微生物の熱エネルギー代謝および、バイオマス生産の制御につながると考えられる。本申請では、マイクロカロリーメーターを用いた微生物の代謝による発熱の詳細な測定と、遺伝子工学的手法による浪費回路の調節により、微生物のエネルギー代謝を制御する方法論を確立することを目的とし、浪費回路により発熱量が増加する、環境温度依存性発熱能を有する微生物 *P. putida* TK1401 の遺伝子組換え法について調べた。また、化学変異により環境温度依存性発熱欠損株を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物が有機化合物の代謝により得るエネルギーは、最終的にバイオマスと熱エネルギーへと変換される。そのため、微生物の熱エネルギー生産を制御することによりバイオマスの生産量の制御が可能となる。バイオマス生産を伴わないエネルギー消費である浪費回路の制御は、微生物の熱エネルギー代謝の制御につながると考えられる。本研究において浪費回路をもつ微生物の遺伝子組換え法について調べた結果や、浪費回路による環境温度依存性発熱の欠損株を取得できたことは、浪費回路の生理的な意義や応用研究につながるものである。

研究成果の概要（英文）：Control of futile pathways, which involve energy consumption without biomass production, is considered to regulate microbial thermal energy metabolism and biomass production. This proposal aims to establish a methodology for controlling microbial energy metabolism by detailed measurement of heat production from microbial metabolism using a microcalorimeter, and by regulating futile pathways through genetic engineering techniques. We investigated the genetic modification of the microorganism *Pseudomonas putida* TK1401, which has the capability for heat production that increases with futile pathways and exhibits environment temperature-dependent heat production. Additionally, we obtained environmental temperature-dependent heat-deficient mutants through chemical mutagenesis.

研究分野：生物物理化学

キーワード：エネルギー代謝

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

活性汚泥法における問題の一つとして、余剰汚泥の廃棄がある。余剰汚泥の増加は活性汚泥中の微生物が汚水中の有機物を分解する際に、自身の栄養源として利用し増殖することによるバイオマス生産が原因である。それゆえ、余剰汚泥を減量するためには、微生物の増殖を伴わないエネルギー消費を行う必要がある。

微生物は栄養源の異化代謝によって得たエネルギーを同化代謝や生体維持などの吸熱反応と共役させることで増殖し、細胞を維持しているが、この共役は非常に効率よく行われていると考えられてきた。すなわち、微生物は自身が最大限に増殖できる様に限られた栄養源を有効に利用するため、増殖や機能保持に直接的に関わらないエネルギー消費をほとんどしないと考えられてきた。しかし、1980年代に Russell らにより微生物の基質消費と使用されるエネルギーの関係が調べられたところ、異化代謝によって得られるエネルギーのうち細胞の増殖や生体維持に使われる以外に消費される余剰なエネルギー (Spilling Energy) があることがわかった。このような経路での基質の消費は“浪費回路 (futile cycle) ”、“overflow metabolism”、“energy spilling reaction” などと呼ばれている。例えば、フルクトース 6-リン酸のフルクトース 1,6-ビスリン酸へのリン酸化とその加水分解によってフルクトース 6-リン酸が再び生じるように、対になった反応は基質回路とよばれている (Fig. 1-A)。多くの場合、基質回路は互いに逆向きの

アロステリック制御が存在するため両方の反応が同時に活性化されることはない。しかし、同位体標識を用いた研究から、生育条件によっては糖新生により脱リン酸化された一部のフルクトース 6-リン酸は解糖系に入り、フルクトース 1,6-ビスリン酸へリン酸化されていることがわかった。このように微生物にみられる、いくつかの基質回路において両方の反応が同時に進行していることが知られている。他にも、カリウムイオンとアンモニウムイオンの膜輸送を介した浪費回路 (Fig. 1-B) や、ATP 生産を伴わないプロトン濃度勾配の解消などが報告されている。このような浪費回路はバイオマスを生産しないエネルギー消費であり、熱の生産を伴う。すなわち、浪費回路の活性化は熱生産を増加させ、バイオマス生産収率を低下させる。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロカロリーメーターを用いた微生物の代謝による発熱の詳細な測定と、遺伝子工学的手法による浪費回路の調節により、微生物のエネルギー代謝を制御する方法論を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

申請者はこれまでに、発熱量を指標とした微生物の探索を行い、生育温度により浪費回路による発熱量が変化する環境温度依存性発熱能をもつ微生物 (*P. putida* KT1401) を単離した。そこで、浪費回路を欠損した変異株を調整し、その性質を明らかにしたのち、浪費回路を再導入することにより、エネルギー代謝を制御する方法を調べることにした。これまでの研究により、この微生物 *P. putida* KT1401 の浪費回路を介した発熱には、尿素サイクル中の酵素 Ornithine carbamoyltransferase (OCT) が関わっていることが示唆されている。そこで、*P. putida* KT1401 中の

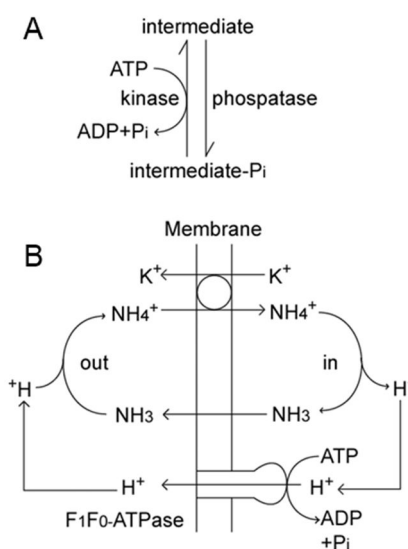


Figure 1 Methods of energy spilling in bacteria. (A) Futile enzyme cycles. (B) Uptake of NH_4^+ via K^+/NH_4^+ antiporter, dissociation of NH_4^+ , passive efflux of NH_3 , and efflux of H^+ via the $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$.

OCT の浪費回路における働きについて調べるために、*P. putida* KT1401 中の OCT 遺伝子を破壊した変異株の作成を試みたが成功しなかった。そこで、環境温度依存性発熱能欠損株を得るために、化学変異による変異株の作成を試みた。変異原としてメタンサルホン酸エチルを用いた。環境温度依存性発熱能欠損株の一次スクリーニングとして、得られた変異株について、コロニー温度測定により、コロニー温度上昇能の欠損した変異株を探索した。コロニー温度の測定には、サーモグラム (Neothermo TVS-700, 日本アピオニクス) を用いた。測定は、インキュベータ内で行い、測定中は培地表面にインキュベータによる送風があたらないように、撮影用の穴を開けた箱でカバーした。インキュベータ内の温度は熱電対式の温度計 (Pt100 温度プローブ, Testo K. K.) を用いて測定し補正を行った。サーモグラムの解析は、解析ソフト (Thermal Video System Version 3.12, 日本アピオニクス) を用いて行った。得られた画像データからコロニーと培地の温度をもとめ、温度差を算出した。解析は、実際のプレートとサーモグラムの画像を照らし合わせて行った。コロニーが存在する領域での温度の平均値をコロニーの温度とし、コロニーの周囲の温度の平均値を培地の温度とした。

一次スクリーニングによって選択した変異体について、培養温度を変えて発熱量を測定し、環境温度依存性発熱能が欠損していることを確認した。発熱量は、次のようにして測定した。菌体を LB 培地に植菌し、シリコ栓をした試験管中で 30 °C、24 h 振盪培養した。得られた菌体懸濁液の 590 nm における濁度を測定し、OD₅₉₀=0.1 になるように LB 培地を用いて希釈した。ガラスバイアル瓶 (φ=20.5 mm x 60 mm) に 2 ml の 1%(w/v) グルコースを含む LB 寒天培地を作製し、そこに希釈した培養液 10 μl を植菌した。発熱量の測定はマイクロカロリーメーター (SuperCRC, Omnical Technologies Inc.) を用いて行った。測定中はフィルター (φ=0.45 μm Millex-GP Filter Unit, Millipore) を装着した注射針を用いて常時通気した。培養温度のコントロールは冷却機能つき恒温水槽 (LabBath LB-21 JR, TAITEC) を用いて行った。菌体一細胞あたりの発熱量は以下のようにして求めた。マイクロカロリーメーター内で熱量をモニタリングしながら微生物を培養し、発熱量が 0.6 ~ 0.8 mW 程度まで上昇した時にガラスバイアルを取り出した。培地上の全菌体を 1 ml の LB 培地で懸濁、回収し 590 nm における濁度から培地上の全菌体数を求めた。菌体懸濁液の濁度と菌体数の関係は、濁度が既知の菌体懸濁液を LB 培地に塗布、培養し形成したコロニーの数を数えることにより求めた。菌体数と発熱量から一細胞あたりの発熱量を算出した。増殖速度は、対数増殖期中の発熱量の経時変化から算出した。

4 . 研究成果

最初に *P. putida* KT1401 の遺伝子組換えを行うために、*P. putida* KT1401 中で複製可能なベクターの探索し、相同性組換えによる遺伝子破壊について検討した。まず、*P. putida* TK1401 に対するプラスミド導入法の検討を行った。広宿主域ベクター pBHR1 を用いて接合伝達およびエレクトロポレーション法による遺伝子導入を試みた結果、*P. putida* TK1401 に対して接合伝達による形質転換が可能であることが明らかになった。次に、作成したプラスミドを用いて、相同性組換えによる遺伝子破壊を行ったが、遺伝子破壊法を確立することができなかった。

次に、環境温度依存性発熱能欠損株を得るために、化学変異による変異株の作成を試みた。変異源としてはメタンサルホン酸エチルを用いた。メタンサルホン酸エチル処理した *P. putida* TK1401 を 1% グルコースを含む LB 寒天培地に塗布し、30°C、48 h 培養後、形成したコロニーの温度を測定した。約 600 株について、コロニー温度の測定を行った結果、温度の上昇が観測されない株を 1 株得た。この株について 16S rRNA の塩基配列を決定し、*P. putida* TK1401 由来の変異株であることを確認した。この変異株を 3-38 株と命名した。

メタンスルホン酸エチル処理により、30°C で培養したときに、温度上昇を示さない変異株 3-38 を得ることに成功した。そこで、この 3-38 株のコロニー温度の培養温度依存性を調べた。野生株および 3-38 株について各温度で培養したときの、コロニー温度と培養温度の差を測定した。野生株では、30°C 付近で培養したときに、培地の温度に比べてコロニー温度が上昇する。一方で、3-38 株では、どの温度で培養したときも、コロニー温度と培地の温度に差は観測されなかった。このことから、3-38 株は化学変異により、コロニー温度を上昇する能力を失ったことが分かった。

これまでの研究により、*P. putida* TK1401 の 30°C 付近におけるコロニー温度の増加は、菌体当たりの発熱量が 30°C において増加する、環境温度依存性発熱によることが示唆されている。そこで、3-38 株の菌体当たりの発熱量の温度依存性を測定し、野生株と比較することにより、3-38 株のコロニー温度上昇能の欠損が、環境温度依存性発熱能の欠損によるものであることを確かめた。は菌体当たりの発熱量と増殖速度の培養温度依存性を野生株と 3-38 株について調べたものである。野生株は 32°C が至適増殖温度である。3-38 株の至適増殖温度も野生株と変わらず、32°C であったが、3-38 株の増殖速度は、すべての温度において、野生株に比べてわずかに低下していた。また、野生株は 30°C の発熱量が他の温度で培養したときに比べて高くなる。30°C における菌体当たりの発熱量を比較すると、3-38 株の発熱量は野生株に比べて減少していた。一方で、30°C 以外の温度では、3-38 株の発熱量は野生株とほとんど同じであった。このことから、3-38 株は、野生株に比べて 30°C においてのみ発熱量が減少していることがわかった。このことから、環境温度依存性発熱能を欠損した変異株を取得できたことが明らかとなった。今後は、この変異株をもとに浪費回路に関係する遺伝子を調べる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tabata K, Komatsu T, Kamachi T.
2. 発表標題 Growth-independent heat production by <i>Pseudomonas putida</i> .
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2021 (国際学会))
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤愛、勝山壮、林貴史、田畠健治、小松生明、櫻田司
2. 発表標題 シノメニンの抗侵害刺激作用機構におけるオピオイド μ 受容体の関与
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------