

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：37107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24655148

研究課題名(和文) バイオマスの生産制御を目指した微生物の発熱機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of extraordinary heat production by *Pseudomonas putida*.

研究代表者

田畠 健治 (Tabata, Kenji)

第一薬科大学・薬学部・准教授

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)：P. putida TK1401株は浪費回路によりバイオマスの生産を伴わないエネルギー消費を行うことができる。本研究では、本微生物の浪費回路を明らかにすることを試みた。発熱に関与するタンパク質をスクリーニングした結果、TCAサイクルに関わる酵素であるスクシニル-CoAシンテターゼと尿素サイクルに関わる酵素であるオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼが本微生物の浪費回路の関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pseudomonas putida TK1401 produces extraordinary heat by growth-independent reaction. In this study, we investigated the mechanism of the growth-independent reaction. A result of differential display, amounts of Succinyl-CoA synthetase (SCS) and ornithine carbamoyl transferase (OCT) were increased at suboptimal growth temperature. SCS catalyzes a production of ATP. On the other hand, OCT is a protein which relates ATP consumption. Therefore, SCS and OCT could be involved in the growth-independent reaction of P. putida KT1401.

研究分野：生物無機化学

キーワード：微生物 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

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いる。しかし近年、微生物でも、増殖や機能保持と関連しないエネルギー消費がおこることが示唆されている。このような反応は Energy spilling reaction や Fatal cycle (浪費回路) と呼ばれ、いくつかの微生物で、その存在が報告されている。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、浪費回路の活性化はバイオマス生産収率を低下させる。そのため、微生物の浪費回路を制御することにより、バイオマス生産性の制御が可能となると考えられる。

申請者は、浪費回路により消費されたエネルギーが熱エネルギーへと変換されることに着目し、微生物が形成したコロニーの温度をサーモグラフィーにより測定することにより、熱産生能の高い微生物を探索した。その結果、一定の条件下でコロニーの温度が培地よりも高くなる微生物を単離した。また、発熱量の測定により、この微生物の発熱量の増加は、増殖速度(バイオマス生産)には相関しないことを明らかにした。これらの結果から、この微生物は浪費回路による発熱機構を有することが分かった。

2. 研究の目的

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、有用物質生産における収率向上や活性汚泥法における余剰汚泥の減量などのバイオマスの生産量の制御が可能となる。申請者はこれまでに、浪費回路による増殖速度に依存しない発熱能を持つ微生物を単離している。本研究では、バイオマスの生産制御を目指して、微生物の発熱機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 浪費回路に関わるタンパク質および遺伝子群の同定

浪費回路に関わるタンパク質を明らかにするために、コロニーの温度が上昇する浪費回路活性化時と、コロニーの温度の上昇が観測されない非活性化時に発現量の変化するタンパク質を、2次元電気泳動によるディファレンシャルディスプレイ法によりした。また、ディファレンシャルディスプレイ法により浪費回路に関連性が示唆されたタンパク質のアミノ酸配列から、浪費回路に関連する遺伝子の特定を行った。

(2) 遺伝子破壊株の調整

ランダム変異により発熱能を欠損した変異株のライブラリーを構築し、非発熱変異体のスクリーニングによる発熱関連遺伝子の探

索も同時に行った。ランダム変異による遺伝子破壊には、トランスポゾンまたは、メタンスルホン酸エチル処理を用いた。

変異体ライブラリーからの非発熱変異体のスクリーニングにはサーモグラフィーを用いたコロニー温度の変化の測定とマイクロカロリーメーターを用いた発熱量測定により行った。このマイクロカロリーメーターは装置内で、微生物の培養を行うことができる装置であり、微生物の増殖に伴う発熱量を正確に定量することが可能である。増殖速度と発熱量の関係を調べることにより、目的の非発熱変異体を得た。

4. 研究成果

(1) 発熱に関与する代謝経路

本研究に用いた微生物 *P. putida* TK1401 は指摘増殖温度(33℃)より少し低い温度で培養した時のみ、発熱量が増加する。そこで、発熱に関わるタンパク質を検出するために 28℃、30℃、33℃ の各温度で培養した *P. putida* TK1401 のタンパク質を二次元電気泳動し、タンパク質の発現量を比較した。この微生物は 30℃ で培養したときに発熱するため、この温度では他の温度に比べて発熱に関わるタンパク質の発現量が増加していると考えられる。可溶画分または、膜画分のタンパク質を 2次元電気泳動し、それぞれのサンプルの画像の強度差から発現量の異なるタンパク質を調べた結果、28℃ や 33℃ に比べて、30℃ で培養したときにのみ発現量が増加するタンパク質を探索した結果、可溶画分において 2種類のタンパク質の発現量が増加していることがわかった。これらのタンパク質をそれぞれタンパク質 A および B とした。膜タンパク質画分に関しては、再現性よく増減しているタンパク質は検出されなかった。分子量マーカー(Precision Plus Protein Standard, Biorad)を基準に分子量を概算したところ、どちらも約 40 kDa だった。

これらのタンパク質をゲルから抽出して N 末端アミノ酸配列を測定した。得られた N 末端配列に関して、相同性検索を行った。

その結果、タンパク質 A は *P. putida* GB-1 由来のスクシニル-CoA シンターゼ(SCS)のサブユニット、タンパク質 B は *P. putida* GB-1 由来のオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ(OCT)と 100%の相同性を示した。それぞれのタンパク質の分子量の理論値は 41.0kDa、37.8kDa であり、電気泳動の結果とほぼ一致した。これらの結果から、*P. putida* TK1401 は 30℃ で培養したときに、SCS と OCT の発現量が増加することがわかった。

ある種の生物は浪費サイクルで ATP を急速に分解することにより発熱し体温を調節している。SCS と OCT もこのような機構での発熱に関わっていると考えられる。SCS は TCA サイクルに関与する酵素である。そこで TCA サイクルに関わる化合物を炭素源とし

て含む M9 培地で *P. putida* TK1401 のコロニーの温度を測定した。その結果、2-オキソグルタル酸を加えるとコロニーの温度が周囲より高くなり、クエン酸、コハク酸、フマル酸では周囲の培地と変わらなかった。この結果から 2-オキソグルタル酸からスクシニルコハク酸を経てコハク酸へ変換される過程が発熱に関与していることがわかった。SCS はスクシニル-CoA をコハク酸に変換する過程で ATP を生産する。そのため、この酵素は浪費サイクルにおいて ATP を供給する役割を持つと考えられる。

また、OCT は尿素サイクルに関与する酵素である。尿素サイクルでは、アルギナーゼによるアルギニンの加水分解と OCT によるオルニチンからシトルリンへの変換が同時に進行することにより ATP を急激に消費し発熱すると考えられる。通常アルギニンが OCT の転写を阻害するため、このような浪費サイクルが進むことはない。*P. putida* TK1401 に関してはそのような阻害機構があるかはわからないが、30°C で培養した場合は OCT の発現量が増加することから尿素サイクルにより発熱すると考えられる。そこで、尿素サイクルに関わる化合物を炭素源として含む M9 培地で *P. putida* TK1401 のコロニーの温度を測定した。その結果、オルニチン、シトルリン、アルギニンのいずれを加えた場合でもコロニーの温度は周囲の培地と変わらなかった。尿素サイクルにより発熱しているとすれば、オルニチン、シトルリンを炭素源として加えたときには発熱量が増加しコロニーの温度が高くなると考えられる。しかし、これらの炭素源を含むにもかかわらずコロニー温度が高くならなかったのは、発熱に使用する ATP の供給量が少ないためであると考えられる。そこで、これらの炭素源にさらに 2-オキソグルタル酸を加え ATP の供給量を増加させて温度測定を行った。測定の結果、どちらの培地で培養した場合もコロニーの温度が周囲より高くなり、2-オキソグルタル酸のみを含む培地で培養したときよりも温度差が大きくなった。また、炭素源としてアスパラギン酸を加えた培地で培養するとコロニーの温度が周囲より高くなることわかった。尿素サイクルの律速段階はシトルリンからアルギニノコハク酸への変換である。この経路はアスパラギン酸がシトルリンと縮合することによって進むため、尿素回路はアスパラギン酸による影響を大きく受けると考えられる。アスパラギン酸を加えた培地でコロニー温度が高くなるのは、尿素サイクルによる発熱が増加したためであると考えられる。これらの結果から、OCT の発現量が増加することにより尿素サイクルでの ATP 消費による発熱が増加することが示唆された。

(2) 遺伝子破壊株の調整

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 株を得ることに成功した。この変異株は環境温度依存性発熱能を欠損していると考えられた。そこで、この 3-38 株のコロニーの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結果、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が、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明らかになった。

これまでの実験により、*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。

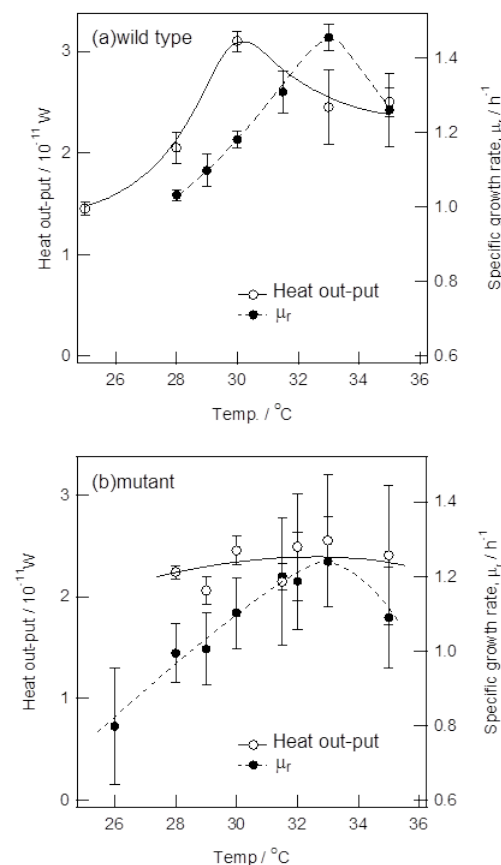


図 野生株と変異株における発熱量の温度依存性

上の図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 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 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、野性株に比べて 30 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、本変異株では、環境温度依存性発熱能を欠損したことにより、コロニー温度の上昇が起こらなかったことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Tabata K., F. Hida, T. Kiriya, N. Ishizaki, T. Kamachi and I. Okura, Measurement of soil bacterial colony temperatures and isolation of a high heat-producing bacterium. *BMC Microbiol.* 査読あり,13, 56 (2013)
DOI:10.1186/1471-2180-13-56

Ito H., F. Mori, K. Tabata, I. Okura and T. Kamachi, Methane hydroxylation using light energy by the combination of thylakoid and methane monooxygenase. 査読あり, *RSC Adv.* 4, 8645-8648. (2014)
DOI: 10.1039/C3RA46870D

[学会発表](計 4件)

アンモニア酸化細菌によるメタン資化細菌由来メタンモノオキシゲナーゼの発現、田島健治、王磊、蒲池利章、大倉一郎、第 42 回石油・石油化学討論会、2012.10、秋田

伊藤 栄紘・森 史也・田島 健治・大倉 一郎・蒲池 利章、葉緑体とメタンモノオキシゲナーゼを利用した光駆動型メタン酸化反応、日本化学会第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、2014.9、岡山
酸素応答性を有するリン光性ビーズの調製と性質の検討、黒川 宏美・富岡 大輔・伊藤 栄紘・田島 健治・蒲池 利章、日本化学会第 8 回バイオ関連化学シンポ

ジウム、2014.9、岡山

軸配位子置換によるシトクロム c₃ への酸化触媒機能の付与、伊藤 力・杉本 太郎・中澤 悠・田島 健治・蒲池 利章、日本化学会第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、2014.9、岡山

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

田島 健治 (TABATA Kenji)
第一薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：80312263