

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660077

研究課題名(和文) 微生物による発熱機構の解明と瓦礫発火の抑制および発電への応用

研究課題名(英文) Studies on microbial fermentation heat production and its application

研究代表者

吉村 徹 (Yoshimura, Tohru)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：70182821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：藍葉の発酵をモデルに発酵熱生成機構の解明を試みた。発酵熱生成には真菌の寄与が大きい。Pantoea や Bacillusなどの細菌の関与も認められた。発熱植物であるザゼンソウでは、AOXによる呼吸鎖ユビキノールの酸化によりATP生成が阻害され発熱することが知られている。細菌でも同様な現象が起こるかどうかを検討するため、E. coliのFoF1 ATPase変異株、atpAとatpCについて、増殖に伴う発熱を微生物生育測定用のカロリメーター、Antaresで計測した。その結果、菌体当りの発熱量は野生株よりATPase変異株の方が高く、細菌においても脱共役が熱生成の要因となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We studied the mechanism of the fermentation heat production with the indigo leaf fermentation as a model system. Several fungal species mainly contributed to the heat production, but some bacteria such as Pantoea dispersa and Bacillus subtilis were also involved in the process. Symplocarpus foetidus, a heat-producing plant, is known to produce heat by the ATP synthesis inhibition through the AOX-catalyzed oxidation of ubiquinone in the respiration chain. To examine if such an uncoupling-ATP synthesis also produces heat in bacteria, the heat production during the cell growth was compared among the wild type and FoF1 ATPase-mutant of E. coli strains, i.e., atpA and atpC. The heat production was assayed with Antares, a calorimeter designed for the bacterial cell growth monitoring. The heat production per cell by the FoF1ATPase-mutant cells was higher than that of the wild-type cells, which suggests that the inhibition of ATP synthesis causes the heat production with bacteria.

研究分野：応用生物化学

キーワード：発酵熱 FoF1 ATPase E. coli

1. 研究開始当初の背景

堆肥が作られる過程において発酵熱が産生されることは古くから知られている。また、稲わらや瓦礫においては時に自然発火が引き起こされる程の高い発酵熱が生成する。このような発酵熱は一般的に微生物による有機物の酸化分解に伴って生成すると考えられているが、その意義や生成機構については未だ本質的な理解がなされていない。発酵熱の生成については、(i) 冬眠する哺乳動物やザゼンソウなどの発熱植物のように、微生物が何らかの生化学的な装置によって積極的に熱産生する場合と、(ii) ATP 生成へ向かうはずのエネルギーが脱共役によって熱としてリークする場合が考えられる。微生物はそれぞれが適した環境に生育すると考えられているが、(i)の場合であれば、発酵熱は微生物が生育に適した温度環境を構築するための手段との可能性もあり得る。

発酵熱の研究を行うにあたり、熱生成のモデルとして藍染め過程に産生される発酵熱に注目した。藍染めは藍葉の発酵(インジゴの濃縮)と色素の還元との二つの発酵過程に分けられる。藍葉の発酵過程では「すくも」が作製される。天日干しにした乾燥藍葉と適量の水を混ぜることにより発酵が開始され、発酵中の藍葉の温度は最高で 70 程度まで上昇する。高温の発酵状態は熟練の職人による水の追加や「切り返し」とよばれる酸素の供給により、約 100 日も持続する。本研究では、このような藍葉の発酵過程(すくも作り)で見られる発酵熱を、実験室において発酵熱を再現するためのモデル系として用いた。

2. 研究の目的

本研究では、藍葉発酵過程で産生される発酵熱の経時変化を観察し、熱産生と微生物の菌叢の関連を明らかにすることを目的とした。また藍葉の発酵過程に生育する微生物の単離・同定を行い、それら微生物の藍葉やその他の培地を栄養源とした際の熱産生能の評価を目指した。さらに、「熱発生が本来であれば ATP 生成に向かうエネルギーフラックスが脱共役することによって熱として放出される」との仮説を検証するための一助として、大腸菌の 2 種の ATP シンターゼ変異株が生成する発酵熱を検討した。用いた変異株のうち atpA 株は FoF1-ATP シンターゼの α サブユニット(ATP 合成・分解の活性中心)を欠いており、電子伝達系と酸化的リン酸化による ATP 合成は完全に脱共役している。atpC 株は 2 つの回転モータ(Fo と F₁)を連結している ϵ サブユニットを欠いており、やはり電子伝達系と酸化的リン酸化による ATP 合成が部分的に脱共役した株である。上記仮説の検証を目的とし、これら両株と野生株の生成する発熱量と菌体量を解析した。

3. 研究の方法

藍葉発酵 乾燥藍葉 100 g と滅菌水 200 ml を混合し、発砲スチロール容器内、30 の保温環境下で発酵させた。内部に温度センサー(おんどり®TR-71Ui, T AND D 社)を差し込み、庫内(藍葉中心部)の温度変化を 10 分間隔で記録するとともに、系の中心部からサンプリングを行った。

メタゲノム抽出 サンプルからのメタゲノムの抽出には NucleoSpin® Soil (TaKaRa 社)を用いた。

PCR-DGGE 以下のプライマーを用いた PCR によって 16S rRNA もしくは 18S rRNA をコードする DNA の増幅を行った。真正細菌特異的プライマー-Fw(GC-984Fw) : 5'- cgc ccg ggg gcc ccg gcc ggg gcg ggg gca cgg ggg gaa cgg gaa gaa cct tac-3', Rv(1378Rv) : 5'-cgg tgt gta caa ggc ccg gga acg-3'(下線部は GC クランプ)。真菌特異的プライマー-Fw(NS1) : 5'-gta gtc ata tgc ttg tct c-3', Rv(GC-Fung) : 5'-cgc ccg ccg cgc ccc gcg ccc gcc ccg ccg ccc ccg ccc cat tcc ccg tta ccc gtt g-3'。DGGE で用いる変性剤濃度勾配ゲルは (138 mm(W) × 130 mm(H) × 0.75 mm(D)) のものを ATTO 社製(型式 AE-6290)ガラス板、ゲル作成器を用いて作製した。

リアルタイム PCR

リアルタイム PCR 定量では下記の真正細菌特異的プライマー、THUNDERBIRD SYBR®qPCR Mix (TOYOBO 社)を用いて、16S rRNA もしくは 18S rRNA をコードする DNA の増幅を行った。PCR 反応は 50 2分、95 1分の後、95 15秒、60 30秒を 40 サイクル行った。細菌用プライマー-Fw (E1115Fw) : 5'- caa cga gcg caa ccc t-3', Rv (1378Rv) : 5'-cgg tgt gta caa ggc ccg gga acg-3'; 真菌用プライマー-Fw : 5'- tta gca tgg aat aat rra ata gga -3', Rv : 5'- tct gga cct ggt gag ttt cc -3'。

Antares R を用いた発酵熱の分析と菌体測定

E. coli の FoF1 ATP 変異株を始めとする数種の微生物が生育時に放出する熱を、微生物生育測定用のカロリメーターである Antares R (けいはんな文化学術協会製)によって測定した。測定する細菌の菌体をそれぞれ LB 培地に植菌して前培養を行い、希釈して、酵母エキス溶液、滅菌済みウッドチップと混合してから専用のバイアル瓶に移し、Antares R を用いて発酵熱量の測定を行った。Antares R 内部を 30 に維持し、バイアル瓶の基底面から放出される熱流束を計測した。測定終了後に得られた木片サンプルよりゲノムを抽出してリアルタイム PCR に供することで、植菌した各変異株の増殖を確認し、菌体の増殖と熱生成の相関について分析した。

4. 研究成果

細菌における発酵熱の分析

以前の研究において、実験室での藍葉発酵では 42 程度までの温度上昇が起こること、温度上昇には *Pantoea* 属の細菌の他、*Rhizopus* 属、*Aspergillus* 属、*Ligtheimia* 属の真菌が発熱に関与する可能性があること、さらに真菌類の発熱への寄与が大きいことが示されている。本研究では発酵熱生成における細菌の寄与について検討した。細菌にとって、藍葉が発酵熱生成の栄養源としては不適切であった可能性もあるため、グルコースやデンプン、トリプトン等の様々な栄養源について発酵熱生成の有無を調べ、細菌の発酵熱を観測可能とする実験系を検討した。その結果、ミキサーで細かく砕いたウッドチップを菌培養の担体として用い、酵母エキスを栄養源とした実験系において細菌の発酵熱が観測された(data not shown)。最高温度は 33~34 を記録した。そこで以後はこの実験系を用いて、細菌の発酵熱についての解析を行うこととした。まず、複数の細菌 (*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、藍葉から単離した *Pantoea calida* の近縁種) の発酵熱について、それぞれの発酵熱量と細胞増殖の相関を調べることで、細菌間で熱産生能に違いがあるのか評価した。その結果を図 1 に示す。

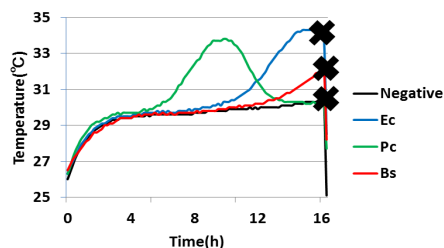


図 1. 細菌各種の発酵熱観測

3 種の細菌を滅菌済みウッドチップに接種して、酵母エキスを栄養源とした発酵熱の分析を行った。表中の×印の時点で発酵を終了し、ウッドチップをサンプリングしてリアルタイム PCR に供した。Negative: 無接種、Ec: *Escherichia coli* K-12 (MG1655) 株、Bs: *Bacillus subtilis* 168 株、Pc: 藍葉より単離した *Pantoea calida*

図 1 に示したように、最高温度は 33~34 と真菌類の最高温度 (42) には満たないものの、すべての細菌種で酵母エキスを栄養源とした発酵熱が観測された。温度の立ち上がりは *Pantoea* 属で最も早く、大腸菌がそれに続いた。枯草菌は今回用いた 3 菌種のなかで最も温度の立ち上がりが遅く、図 1 では最高温度まで達していない。しかし培養時間を 18 時間以上にして実施した別の実験においては、最高温度 34 以上を記録した(data not shown)。なおデータは示さなかったが、リアルタイム PCR の結果では、無接種のコントロ

ールにおいては菌の増殖は殆ど起こっていないこと、一方、菌種を接種した系においては植菌した菌が増殖していることが確認され温度上昇は、接種した菌の増殖に伴う事が確認された。

ATP 生合成系の脱共役と発酵熱

真核生物においては、脱共役剤 (2,4-ジニトロフェノール: DNP、カルボニルシアニド-*m*-クロロフェニルヒドラゾン: CCCP) や脱共役タンパク質 (UCP1、AOX) が電子伝達系におけるプロトン濃度勾配を消失させ、細胞からの発熱を促進させる作用をもつことが知られている。そこで脱共役剤の発酵系への添加が菌体からの発熱に何らかの影響を与える可能性を検証するため、DNP 存在下における細菌の増殖と発酵熱について分析した。しかし、リアルタイム PCR の結果では DNP の存在下では菌の増殖は抑制されており、顕著な温度上昇も得られなかった (data not shown)。

脱共役と発酵熱生成の関連を明らかにするため、*E. coli* の ATP シンターゼ変異株の発酵熱分析を試みた。本研究では微小な熱発生を検出するため、けいはんな文化学会の高橋らが開発した特殊なマイクロカロリメーターであり、試料中の微生物増殖に伴う熱生成を、ゼーベック効果を利用して電流シグナルへと変換し、増殖サーモグラム (growth thermogram) としてリアルタイムで表示することができる Antares R を用いて解析した。その結果を図 2 に示す。

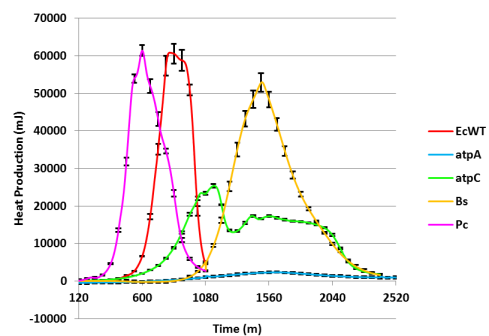


図 2. Antares R 測定結果

3 種の細菌を酵母エキスを加えた滅菌ウッドチップに接種し、Antares R を用いて発酵熱の分析を行った。無接種のネガティブコントロール(ブランク)は 2 連で、細菌を植菌した他のサンプルは 3 連で行った。各サンプルで測定された検出値からブランクを差し引き、熱量 (mJ) に換算したデータをグラフに表した。なお EcWT と Pc は測定開始後 1080 分、atpC と Bs は 2400 分、atpA は 2520 分の時点で測定を終了し、凍結保存した (n=3)。

図 2 から得られた発酵熱の総量を図 3 に記す。

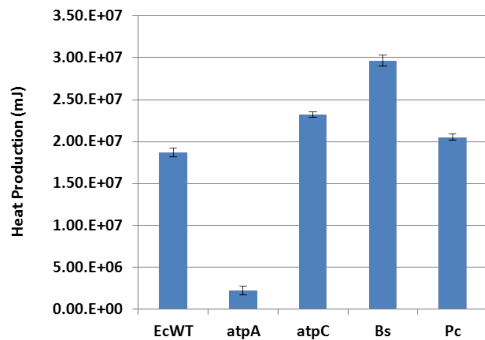


図3 各細菌より産生された発酵熱総量

図2をもとに、各細菌種について曲線と横軸に囲まれた面積を算出し、産生された発酵熱の総量とした。(n=3)

リアルタイム PCR により得られたそれぞれの菌体数量と、これをもとに算出した各種菌体の菌体当りの発熱量を表1にまとめた。

表1 各細菌種の熱産生能

菌種	発酵熱総量	細菌数	熱産生能
EcWT	1.87.E+07	2.84E+10	6.58.E-04
atpA	2.27.E+06	1.87E+09	1.22.E-03
atpC	2.33.E+07	3.24E+09	7.17.E-03
Bs	2.96.E+07	7.36E+09	4.02.E-03
Pc	2.05.E+07	1.36E+11	1.51.E-04

また Antares による計測を行った後のウッドチップ(0.5 g)から ATP を抽出し、ルシフェリン/ルシフェラーゼ法による ATP 定量を行った結果を図4に示した。

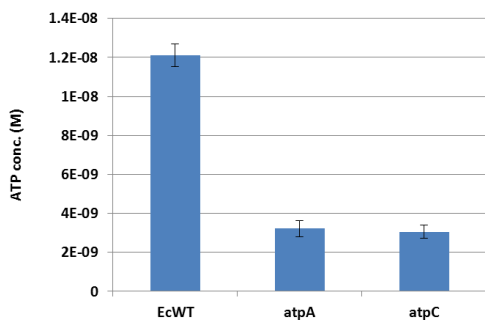


図4. 木片サンプルに含まれる ATP 量 (n=3)

ATP シンターゼ変異株(atpA、atpC)と野生型(EcWT)で、図2のグラフに描かれた曲線の形には大きな差異が見られた。atpCにおける熱産生の開始時間は EcWT と同じ測定開始後600分頃であったが、シグナルの立ち上がりが緩やかであった。さらには開始後1080分で最高点を迎え一度下降してきたにもかかわらず、1320分頃から再び持ち直し、その後2400分頃まで熱産生が見られた。縦軸の最大

値は EcWT の半分にも満たなかったが、3倍以上の長時間にわたり熱産生を維持し続けた。このように野生型では見られなかった曲線の形は、atpC株の菌体内で大きな代謝変化が起こったことを示している可能性がある。一方の atpA においては1080分を過ぎた頃ようやくシグナルの上昇が現れ、縦軸の最大値も EcWT や atpC に比べかなり小さかったが、2520分まで熱産生が維持された。図3で示した発酵熱総量を比較したところ atpC > EcWT > atpA という結果になり、atpCより放出された総熱量は EcWT をも上回っていたことが明らかとなった。

生育について分析したところ、細菌数は EcWT >> atpC > atpA の順に多く存在していることが分かった(表1)。この順番も発熱が観測された順番と一致していた。今回の実験において、変異株の菌数は EcWT のそれよりも随分少なかった。なお、データには示さなかったが発酵前サンプルで算出された Ct 値はリアルタイム PCR で用いた標準曲線の範囲よりもさらに小さく外れているため、発酵前の細菌数は発酵後に比べて十分小さいと考えられた。すなわち発酵前の細菌数が発酵熱総量に与える影響はほとんどないと予想された。そこで、発酵後の細菌数のみを用いて熱産生能の評価を行うこととした。

表1に示したように、発酵熱総量を発酵後の細菌数で割って、細胞あたりの熱産生能(mJ/cell)を算出した。この結果より、今回の実験における ATP シンターゼ変異株の熱産生能は atpC > atpA > EcWT と結論づけられた。Antares R を用いてより厳密に発酵熱を測定したことで微弱な放熱も捉えることが可能となり、細胞あたりの総放熱量について変異株が野生株を上回ることが明らかとなった。

ATP シンターゼ変異株は不完全な ATP シンターゼ複合体を有するため、電子伝達系と酸化的リン酸化による ATP 合成が脱共役している。atpA 株では酸化的リン酸化による ATP 合成の活性部位が欠損しているため完全に脱共役し、解糖系における基質レベルのリン酸化を活性化させることで生育のための ATP を補う。これに伴って、解糖系で産生される過剰な NADH を消費するため、呼吸鎖酵素(NADH デヒドロゲナーゼ2: NDH-2 とシトクロム bd オキシダーゼ: Cytbd)の活性も上昇することが知られている。NDH-2 や Cytbd は、NDH-1 や Cytbo ほど高いプロトン駆動力形成能をもたないが、電子伝達系と ATP 合成の脱共役による熱産生に寄与している可能性がある。発熱植物として知られるザゼンソウの呼吸鎖には代替オキシダーゼ(AOX)が存在しており、プロトン濃度勾配を形成することなく酸素に電子を受け渡す電子伝達系の代替経路を形成している。この経路を通ることで、電子が流れる際に遊離する自由エネルギーは ATP として保存されることなく熱として放出される。つまり変異株で活性化されている

Cytbd もこの AOX と同様の機構で熱産生を引き起こしている可能性がある。また、不活性 ATP シンターゼを通したプロトンの受動輸送に伴う発熱、すなわち脱共役タンパク質 (UCP1) と同様の機構による熱産生も起こっている可能性も考えられる。atpC 株でも Fo と F1 をつなぐ部分に欠損があるため部分的な脱共役が起きている。よって atpA 株ほどではないにしろ、同様に解糖系、呼吸鎖の活性化が引き起こされていると考えられる。図 2 においてみられた変異株の長時間の熱産生は、電子伝達系の脱共役が引き起こしている可能性がある。

今回の実験では完全な脱共役をしている atpA 株よりも、部分的にしか脱共役していない atpC 株の方で熱産生能が高いという結果が得られており「脱共役が熱産生に寄与している」と単純には結論できない結果となった。これは、発酵熱生成は産生された ATP が他の生化学反応と共役されることなく加水分解されることによって起こり、その際に不完全な atpC 変異型 ATP シンターゼが機能しているという可能性を考えることで説明できるかもしれない。これに関して菌体内 ATP 濃度を分析したところ、atpA : atpC : EcWT 4:2:1 という結果となった (data not shown)。これは以前に報告されている数値と近いものであった。変異株は酸化的リン酸化による ATP 合成が阻害されているにもかかわらず菌体内 ATP は高い数値となっていた。今回の実験において、菌体内 ATP 濃度と産生される発酵熱の間に明確な関連は、菌がより大きな熱産生能を示すためには ATP 合成と脱共役のバランス関係が重要である可能性がある。いずれにせよ今後解明していかなければならない課題であろう。

菌の増殖と発熱はパラレルな関係にあると考え易いが、atpA 株と atpC 株を比較したところ、生育は同程度であるにもかかわらず放出された発酵熱量には大きな差が認められ、必ずしも菌の増殖と発熱はパラレルではない。図 2 において、どの菌種においても見られた最初の急激な熱生成の上昇は細菌の増殖によって引き起こされたものと思われるが、ATP シンターゼ変異株で見られた長時間にわたる緩やかな熱生成は、増殖によってではなく脱共役などによる代謝の変化が引き起こしていた可能性もある。このような問題を解明するためには、単位秒当たりの発酵熱量が最高となった時点でもサンプリングを行い、発酵終了時との細菌数の比較を行うことで、ATP シンターゼ変異株で見られた長時間にわたる緩やかな熱生成に細菌の増殖が伴っていないことを確認するなどの検討を行う必要がある。

なお本研究の計画段階では、震災瓦礫の発火が大きな問題となっていた。研究代表者は、本研究課題が示すように、瓦礫発火に関わる微生物を解析し農業用に用いられる低価格の抗生物質や殺菌剤を用いてこれを制御す

るとの計画を立てていた。実際に現場で発火処理に当たる業者や村役場の担当者と連絡をとり発火場所でのサンプリングを行う予定まで立てた。しかし許認可権を有する県からの意思決定が極めて遅く、断念せざるを得なかった。これは研究の進め方に対する課題として残った。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

西村佳祐、伊藤智和、高橋克忠、羽田亜紀、邊見久、吉村 徹 発酵熱の生成機構に関する研究 2014 年度日本農芸化学会大会 明治大学、2015 年 3 月 27 日～30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 徹 (YOSHIMURA, Tohru)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号： 70182821