膜を基軸とする微生物代謝の分子基盤と機能開発

山口大学大学院創成科学研究科　山　田　　守

はじめに

これまで，呼吸鎖電子伝達系，膜透過タンパク質，糖の取り込み，膜ストレスと細胞死，発酵など微生物の「膜」に関連した研究を展開してきた．これらは細胞の生存にとって重要な基盤的代謝であると同時に得られた知見は有用物質生産に利用できる．その中で，呼吸鎖初発酵素の構造と機能，オペロン構造と発現調節機構，ストレス誘導性細胞死による長期定常期等での微生物集団の生存機構，耐熱性の分子機構と耐熱化，耐熱性微生物を用いた高温発酵とグリーンエネルギー生産技術開発は特筆できる成果と考えている．それらを含めて以下の4点としてまとめて紹介する．

1.　呼吸鎖電子伝達系と初発酵素グルコース脱水素酵素の解析

緑膿菌，ザイモモナス菌，耐熱性酵母等の呼吸鎖電子伝達系の構成成分の解析を行うとともに，シアン耐性オキシダーゼやシトクロム *c* ペルオキシダーゼの存在を示した．中でも，大腸菌の呼吸鎖初発酵素グルコース脱水素酵素について，a）膜トポロジー解析によってN末側疎水領域が5回膜貫通しC末側触媒領域がペリプラズム側に存在すること，b）再構成実験によってプロトンポンプ能がないこと，c）モデル構造に基づいた補酵素PQQを取り囲むアミノ酸残基の変異体解析によりグルコースからプロトンを引き抜くAsp466やPQQH_2からの電子移動に必要なLys493を推定した（図1）．また，d）パルスラジオリシス法によるレドックスセンター間の電子移動解析により，結合型キノン（BQ）が酵素分子の表面近くに存在することや電子移動速度からPQQとBQは直接電子を受け渡すことが可能な14 Å離れて位置することを推定した（図1）．さらに，e）メナキノンがユビキノンに代わってBQ結合サイトに結合し，電子の受け渡しができることを示した．

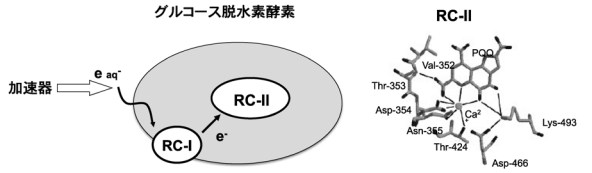

図1.　グルコース脱水素酵素における分子内電子移動の解析
加速器からのパルス電子線を用いたパルスラジオリシスによって水和電子が生じ，その電子がBQ（RC-I）から補酵素PQQ（RC-II）へと移動した．

2.　遺伝子，オペロン，ゲノムの解析

バクテリオシンの1つであるコリシンE1チャネルの遺伝子や大腸菌のグルシトール（ソルビトール）の取り込み・異化に関わる *gut* オペロン，グルコン酸の取り込み・異化に関わる *gnt* オペロン等の構造と発現調節機構について解析した．コリシンE1において膜透過に関わる内在性膜透過シグナル配列を推測するとともに，変異体解析により膜透過やバクテリオシン活性に必要なアミノ酸残基を特定した．*gut* オペロンは正と負の調節因子及びcAMP-CRPによる発現調節を，*gnt* オペロンは負の調節因子及びcAMP-CRPによる発現調節を受けることを示した．また，調節遺伝子と構造遺伝子との転写の組み合わせにより巧妙な転写制御が推測された．耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3–1042の完全ゲノム解析及び異なる4条件でのトランスクリプトーム解析によって，幅広い糖資化スペクトルを可能にする輸送体を含めた遺伝子群や耐熱性に関連する遺伝子群の存在を示すとともに，高温での特徴的な転写調節を見出した．さらに，グルコース抑制機構の中心的な転写調節因子Mig1が他の複数の転写調節因子の発現制御を介して1,000以上の遺伝子の発現調節をしていることを示唆した．

一方，アデニル酸キナーゼのN末に膜透過時に切断を受けない内在性のミトコンドリア膜透過シグナル配列を推定した．また，ホスホトランスフェラーゼ系のEnzyme IIに共通する，膜局在に関わるミトコンドリア膜透過シグナル配列に類似した両親媒性配列を見出した．

3.　大腸菌のストレス誘導性溶菌の研究

大腸菌は定常期初期に酸化ストレスを蓄積し，これによって障害を受けた細胞はシグマE依存性溶菌（SEDL）機構によって除去されることを発見した．また，外膜タンパク質のポリン等の構造変化が引き金となる遺伝子発現カスケードを明らかにし，SEDLがプログラム細胞死であることを提唱した．驚いたことにSEDLの主要遺伝子（small RNA）が欠損すると死滅期後に続く長期定常期での生存を不可能にしたことから，SEDLは障害細胞の除去だけでなく栄養源の供給によって自然界に近い長期定常期での細胞集団の維持に寄与するものと推測される（図2）．さらに，重篤なDNA障害が起こるとその細胞はSulA依存性溶菌（SADL）機構によって除去されること及びその遺

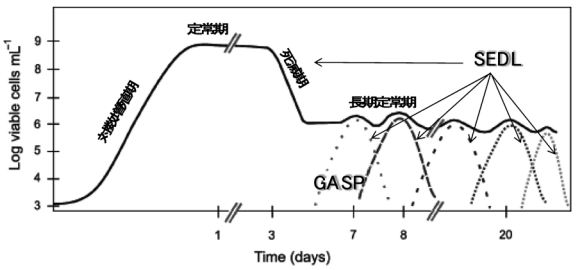

図2.　長期定常期におけるシグマE依存性溶菌（SEDL）の役割
長期定常期では変異によってGrowth Advantage in Stationary Phase（GASP）を有する細胞が順次入れ替わっていると考えられている（Llorens *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.* 2010）．先行するGASP細胞が酸化ストレスなどによって障害を受けると，SEDLによって細胞が破壊され，その細胞内容物等が次のGASP細胞の栄養源になると推測される．

伝子発現カスケードを明らかにした．上記の２つのプログラム細胞死は細胞集団の中で障害を受けた細胞を除去することによって種の保存に寄与していると考えられる．

4. 耐熱性機構，耐熱化，高温発酵の研究

4-1. 耐熱性遺伝子の特定と耐熱性機構

常温菌の中には耐熱性を有するものが存在する．その遺伝学的背景を明らかにするために大腸菌，耐熱性ザイモモナス菌，耐熱性酢酸菌を対象に，各々において耐熱性の原因遺伝子（耐熱性遺伝子と命名）を特定した．大腸菌では１遺伝子破壊株ライブラリーを用いて，残りの２菌ではトランスポゾン挿入変異ライブラリーを作製し，限界生育温度で温度感受性を示す株を選抜，解析することで，これらの耐熱性遺伝子の機能的分類や変異による表現型に基づいて共通する耐熱性機構を提唱した（図3）．なお，熱ショック蛋白質（HSP）遺伝子がほとんど含まれないことから熱ショック応答とは異なる．

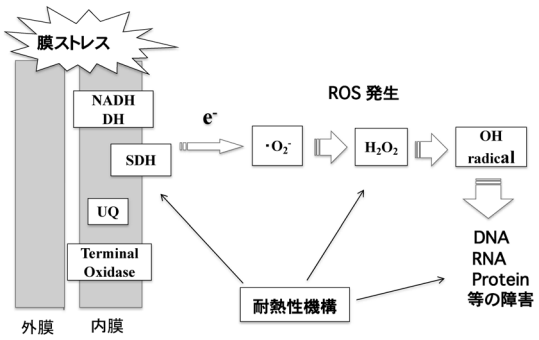

図3. 共通する耐熱性機構
大腸菌，耐熱性ザイモモナス菌，耐熱性酢酸菌の網羅的な耐熱性遺伝子探索の結果に基づいて，共通する耐熱性機構を提唱した．細長い矢印は主な作用点を示す．

K. marxianus は代謝フロー切り替えによって高温での生存を可能にすることを見出した．即ち，高温でより多く蓄積する酸化ストレスを解消するために，高温では解糖系の抑制とペントースリン酸経路の促進によって NADPH の生産性を高めるとともに，グルコースが消費されるとエタノールの分解系で NADPH を供給することが判明した．同様な代謝フロー切り替えが転写調節因子 Mig1 の破壊株で見られることから Mig1 抑制機構が働いている可能性が考えられる．

4-2. 耐熱化と耐熱化の限界

微生物の高温適応の理解やより安定な高温発酵系の構築のために，高温適応育種（耐熱化）を試みた．同時に，耐熱化の正確な評価のために生育限界温度の決定方法を確立した．耐熱化はザイモモナス菌2株と大腸菌1株について温度を徐々に上げながら耐熱化限界まで繰り返し培養を実施した．その結果，それぞれ 2℃高温で生育できる株を得た．さらに限界を見極めるために，耐熱化株をミューテータに改変し，それを用いて高温適応育種を耐熱化限界まで実施したところ，さらに 1℃高温で生育できる株を得た．これらの結果により耐熱化限界が最大 3℃であることが示唆された．また，2種2株をそれぞれ複数並行して高温適応育種を行ったところ，同様な表現型や遺伝型をもつものがそれぞれに得られたことから高温適応において多様性が極めて低いことが分かった．これらの結果は急激な地球温暖化が進行するとヒトの生活温度領域で棲息する微生物の生存が脅かされる可能性を暗示する．続いて，耐熱化変異株の個々の変異を親株ゲノムへ導入することによって耐熱化の原因遺伝子を特定した．また，活性酸素種（ROS）消去酵素や HSP 等の遺伝子発現強化あるいは Mg^{2+} や K^{+} の添加によってもそれぞれ 1℃程度耐熱化できることを示した．

4-3. 次世代型高温エタノール発酵およびその関連技術の開発と多様な耐熱性酵母の開発

発熱を伴う発酵は安定な発酵のために冷却が不可欠である．そこで，冷却が不要となる 40–42℃でのエタノール高温発酵の検討およびそのために不可欠な耐熱性酵母の開発を行った．国際共同研究事業等で種々の耐熱性酵母を分離し，発酵特性や耐熱性を含めた高温発酵のための基礎研究を実施した．また，高温発酵および温度非制御発酵の実証試験（MEXT-ARDA プロジェクト）を行い，それらの有用性や実用性を検証した．さらに，40–45℃での減圧蒸留と膜分離を組み合わせることによって高濃度エタノール化に成功した．加えて，それらの技術と改質エンジン（低濃度エタノールを水素に変換し，発電）を組み合わせ，食品残渣等をグリーンエネルギーに変換する技術並びにシステム開発を県及び環境省のプロジェクトとして進めている．このコンパクトなシステムは今後，過疎地や災害地への活用も期待される．

おわりに

生体エネルギーに関わる呼吸鎖電子伝達系の研究は糖の取り込み，ROS生産や膜ストレスと細胞死の理解に繋がり，膜ストレスと細胞死の研究は長期定常期等での微生物集団の生存機構の理解に繋がっている．これらの理解は発酵微生物のストレス耐性強化や高温発酵の研究に生かされている．恩師の助言を踏まえて，膜に基軸を置いて研究を進めた結果ここに紹介する成果を生み出すことができたと思っている．

謝　辞　本受賞に際し，学部から修士課程においてご指導を賜りました故・飴山実先生（山口大学名誉教授），足立収生先生（山口大学名誉教授），松下一信先生（山口大学名誉教授），品川恵美子先生（元宇部工業高等専門学校教授），博士課程においてご指導を賜りました中澤淳先生（山口大学名誉教授），中澤晶子先生（山口大学名誉教授），蛯名洋介先生（徳島大学名誉教授），三木徹先生（長岡技術大学名誉教授）に感謝いたします．ポスドク時代に糖輸送体研究等のご指導を賜りました Milton H. Saier, Jr. 先生（California大学San Diego校教授）に感謝いたします．本研究は主に山口大学農学部情報生化学研究室において遂行されました．ご協力いただいた故・村田正之博士，高坂智之博士（現・山口大学准教授），博士研究員，大学院生，学部生，共同研究者や企業の方々に感謝いたします．