

高温下における微生物の代謝ボトルネックの探索

柘植 陽太

金沢大学 新学術創成研究機構

研究の目的

微生物にはそれぞれ増殖可能な温度範囲が存在しており、その温度範囲で好冷菌、中温菌、好熱菌、超好熱菌などに分類される。好熱菌や超好熱菌では高温下で増殖可能な原因を探る多くの研究例があり、細胞膜の脂質の結合様式やタンパク質のアミノ酸組成の違い、DNA の保護機能の存在などが理由として考えられている。一方、中温菌は 25°C から 40°C 付近の範囲で増殖するが、何が増殖限界温度を規定しているかは不明な点が多い。高温下では細胞内で活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) が発生するため、核酸の損傷や脂質の過酸化、タンパク質の変性を引き起こすことが増殖停止の一つの要因と考えられているが¹⁾、具体的な原因分子は不明である。

物質生産に利用される工業細菌の多くは中温菌であり、微生物を用いた物質生産ではコンタミネーションの防止や冷却コストの削減のために、高温下で増殖できることが望ましい。そのため、実験室内進化実験により高温下で増殖可能な変異株が様々な物質生産菌で取得されている^{2,3)}。しかし、このような高温耐性株の取得を通して増殖限界温度を規定する因子を明らかにすることは困難である。

我々はアミノ酸生産菌のコリネ型細菌を用いて高温下における代謝状態を調べてきた。コリネ型細菌は好気条件下で増殖するが、嫌気条件では増殖できない。しかし代謝は維持され、バイオプラスチック原料の乳酸とコハク酸を生産する。コリネ型細菌は 40°C を超えると増殖は停止するが、嫌気条件下におけるグルコース消費速度の温度依存性を調べたところ、増殖限界温度を超える 43°C においてグルコース消費速度が最大となり、乳酸とコハク酸の生産速度も増加することが分かった⁴⁾。従って、解糖系や一部の TCA 回路におけるグルコース代謝の至適温度は増殖限界温度を超える温度であり、増殖できない高温下でも機能を喪失していないことが分かった。代謝の観点から高温下で増殖できない理由を考えると、解糖系より下流の代謝反応が阻害されることによりいずれかの細胞構成成分が合成できないためである可能性が考えられた。そこで本研究ではコリネ型細菌を好気条件、高温下で培養して代謝状態を調べることで、高温下における代謝のボトルネックを明らかにすることを目的とした。

方法

コリネ型細菌の野生株 (*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032) を合成培地でフラスコ培養し、対数増殖期の細胞を採取した。洗菌後、増殖温度 (30°C) の培養試験では初期 OD₆₀₀=0.8、非増殖温度 (43°C) では OD₆₀₀=10 となるように合成培地に植え継ぎ、ジャーファーメンターで好気培養試験を開始した。pH は 7.0 に制御し、通

気量 1 vvm で培養した。溶存酸素レベルは 30°C の飽和酸素濃度の 20% 以上を保つように攪拌を制御した。2 時間毎に分光光度計を用いて OD₆₀₀ を測定し、代謝物分析と発現解析、酵素活性測定用のサンプリングを行った。細胞外代謝物は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析し、CO₂ 濃度は排気ガス分析計で測定した。

結果

はじめに本実験条件におけるコリネ型細菌の増殖限界温度を調べるために、野生株を栄養培地 (BHI) と合成培地 (BTM) でフラスコ培養した。その結果、栄養培地では 43°C で増殖が停止し、合成培地では 40°C で停止した。従って、本研究ではコリネ型細菌の非増殖温度を 43°C とした。

次に 43°C における細胞膜の損傷を調べるため、30°C、43°C で培養した細胞を SYTO9 と propidium iodide によって染色した。その結果、43°C では 30°C に比べて死細胞の割合が増加したものの、培養開始 10 時間後でも 88.6% の細胞は細胞膜の損傷が起きておらず、生細胞として識別された。従って、コリネ型細菌は増殖できない高温下でも大部分の細胞は死滅しておらず、増殖できない原因は細胞膜の損傷ではないと示唆された。

次に、ジャーファーマンターを用いて 30°C と 43°C で培養したところ、43°C では細胞の増殖は見られなかったが、グルコースは消費した。しかし嫌気条件下とは異なり、単位菌体量当たりのグルコース消費速度は 30°C で 0.65 g-glucose/g-CDW/h だったのに対し、43°C では 0.45 g-glucose/g-CDW/h と 31% 低下した (図 1)。次に消費したグルコースが何

に変換されているのかを調べた。30°C では 47.6% が菌体に、46.4% が CO₂ に変換された一方、43°C では 27.7% が CO₂ に変換され、菌体の代わりに代謝物 (乳酸、ジヒドロキシアセト

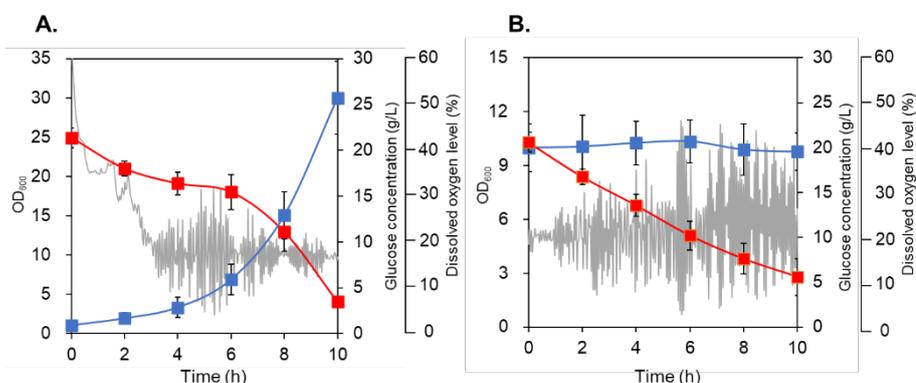


図 1 30°C (A) と 43°C (B) における細胞濁度 (青色)、グルコース濃度 (赤色)、溶存酸素濃度 (灰色)

ン (DHA)、グルタミン酸、 α -ケトグルタル酸、ピルビン酸) に変換された (図 2)。乳酸は酸素欠乏条件下でのみ生成するが、同様に生成するコハク酸は確認できなかった。DHA は嫌気条件下において解糖系の遺伝子を高発現した場合に蓄積することが報告されている。これらの結果から、43°C ではピルビン酸を基質とするピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) が失活した可能性が考えられた。そこでピルビン酸に関連する酵素の活性を調べた。その結果、43°C では PDH の比活性が見られなかった一方、

乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の比活性は 30°C と同等の値を示した。以上により、高温下における代謝変動の原因の一つは PDH の失活であることが示唆された。

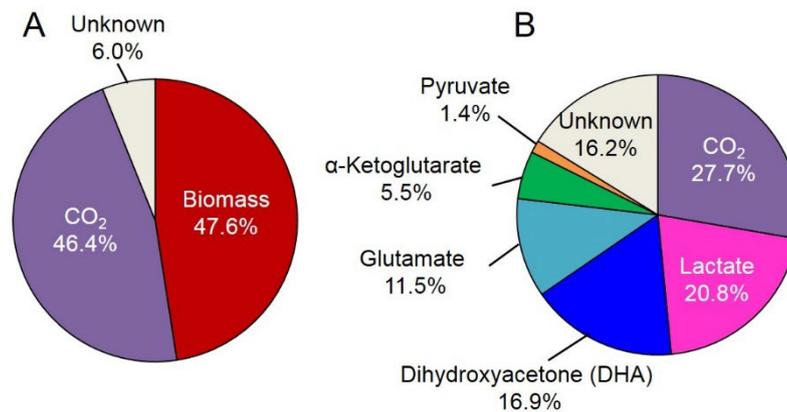


図 2 30°C (A) と 43°C (B) におけるグルコースの変換産物

大腸菌 (*Escherichia coli* BL21(DE3))

でも同様の実験を行った結果、非増殖温度 (50°C) ではコリネ型細菌と同様、LDH の比活性は増殖温度 (37°C) と比較して同程度であったにもかかわらず、PDH の比活性は消失した。以上の結果から、PDH は中温菌で共通して他の代謝酵素よりも高温への耐性が低い可能性が考えられた。

結論

本研究ではコリネ型細菌が増殖できない高温下で代謝変動を起こし、その一因が PDH の失活である可能性を明らかにした。今後は PDH を高温でも機能する遺伝子に置換することで代謝のボトルネックを解消し、より下流のボトルネックを探索する。また、43°C では 16.2% のグルコースが解糖系・TCA 回路に存在する代謝物以外の未知化合物に変換された。高温下では通常の培養温度とは異なる代謝経路が機能する可能性も考えられることから、残りのグルコースが変換された代謝物を探索する予定である。

文献

- 1) Matsushita, K. *et al.* (2016) Genomic analyses of thermotolerant microorganisms used for high-temperature fermentations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**: 655-668.
- 2) Oide, S. *et al.* (2018) Thermal and solvent stress cross-tolerance conferred to *Corynebacterium glutamicum* by adaptive laboratory evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 2284-2298.
- 3) Matsumoto, N. *et al.* (2018) A single-nucleotide insertion in a drug transporter gene induces a thermotolerance phenotype in *Gluconobacter frateurii* by increasing the NADPH/NADP⁺ ratio via metabolic change. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**: e00354-18.
- 4) Uchikura, H. *et al.* (2020) Anaerobic glucose consumption is accelerated at non-proliferating elevated temperatures through upregulation of a glucose transporter gene in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**: 6719-6729.