【解説】

耐熱性発酵微生物の耐熱性を 賦与する分子機構

山田 守^{*1,4}, 赤田倫治^{*1,4}, 高坂智之^{*2,4},
東 慶直^{*3}, 星田尚司^{*1,4}, 松下一信^{*2,4}

地球温暖化やその影響が顕在化し、CO₂排出抑制につながる新たなエネルギー削減技術の開発が求められている。発酵産業においても同様で、耐熱性微生物を用いることによって省エネ型の高温発酵が可能になり、これが次世代型の発酵技術として期待される。その実現のため、安定な高温発酵系の構築に向けた基盤的情報として耐熱性発酵微生物のもつ耐熱性分子機構の把握は不可欠となる。

耐熱性発酵微生物とは

ここで取り上げる「耐熱性」は、一般的に乳製品などを取り扱う食品業界などで使用する耐熱性とは異なる。たとえば、ある乳製品加工協会では、工場に集積する乳について加工製品の品質保持に悪影響を及ぼす混入菌（変敗菌）の調査試験を実施しているが、そのうち、耐熱性菌の定義については低温殺菌条件（63℃で30分間

の加熱処理）において生存可能な細菌としている。そのなかには、*Bacillus*属や*Streptococcus*属、コリネ型細菌、放線菌類、*Staphylococcus*属、*Enterococcus*属、*Micrococcus*属などが検出されることがある。また、ある食品分析機関では、検査試料原液を70℃で20分間加熱処理し生き残る菌を芽胞形成菌あるいは耐熱性菌としている。一方、本解説で対象とする耐熱性は、中温菌が高温環境に適応し、10～15℃程度高い温度で増殖（発酵）できる特性を示す⁽¹⁾。すなわち、同種間または近縁種間で比較した場合に、ある株に対してより高い温度で増殖（発酵）できる表現型を耐熱性と定義する。しかしながら、長い年月を経てその表現型は種が異なるほどに広がり、耐熱性をもつ新たな種を生み出している可能性も考えられる。また、耐熱性を賦与する遺伝子（耐熱性遺伝子）群が水平伝播し、その結果耐熱性を獲得する場合も考えられる。このように、ここで紹介する耐熱性発酵微生物は好熱性菌や超好熱性菌とも異なる。なお、本解説で使用する「耐熱性遺伝子」とは、遺伝子破壊によって生育可能な限界温度領域での増殖が不可能となった変異体の解析から明らかとなった限界高温域での増殖に必要な遺伝子として定義している。

Molecular Mechanisms of Thermotolerance of Thermotolerant Fermentation Microorganisms

Mamoru YAMADA, Rinji AKADA, Tomoyuki KOSAKA, Yoshinao AZUMA, Hisashi HOSHIDA, Kazunobu MATSUSHITA,
^{*1} 山口大学大学院医学系研究科, ^{*2} 山口大学農学部, ^{*3} 近畿大学生理工学部, ^{*4} 山口大学中高温微生物研究センター

われわれは、タイ国を中心とした国際拠点事業を通じて、熱帯性環境に棲息する微生物のスクリーニングから耐熱性発酵微生物の存在を明らかにしてきた⁽¹⁾。耐熱性発酵微生物はその性質から従来の発酵法よりも10℃程度高い温度での発酵、すなわち、高温発酵を可能にする。高温発酵は、発酵産業においてCO₂の削減の要請や冷却経費の高騰に対処できる有効な技術の一つとして期待され、たとえば、エタノールの高温発酵では、冷却設備費や冷却のためのランニングコストの削減、雑菌混入の抑制、管理の簡易化、並行複発酵では糖化酵素量の低減など多くのメリットが見込まれる⁽²⁾。仮に、世界のバイオエタノールをすべて現在より10℃高い温度で発酵生産したとすれば、ざっと見積もって年間約500万トンのCO₂の削減が見込める。発酵生産時の発熱量は発酵生産物によって異なるが、酢酸発酵やアミノ酸発酵について、発酵熱と世界の生産量から考えると、併せて年間500万トンの削減効果があると試算できる。抗生物質、ビタミン、バイオガスなどの発酵生産にまで高温発酵を普及させたときの効果はさらに数倍～1億トンに上ると期待できる。このように、耐熱性発酵微生物をうまく活用すれば、今後必要となる次世代型の発酵技術を構築できると考えている。

そのためにも、基盤となる耐熱性を賦与している分子機構の把握が必要となるが、これによってより安定した高温発酵技術の構築が可能となるだけでなく、耐熱性分子機構を従来の発酵性微生物に導入することによって耐熱化が図れれば、長年培われた多くの発酵技術をさらに有効利用することができる。一方で、中温菌はそれぞれ異なる温度域に生育限界温度をもっており⁽³⁾、進化的な背景から共通した耐熱性機構の存在が予想されるが、温度域に応じた複数の耐熱性機構が存在し、それらの組み合わせによって個々の種の生育限界が決定されている可

能性が予測される。もしそうであり、複数の耐熱性機構が解れば、種に応じた耐熱性強化策を講じることができると。本解説では、われわれが最近行った発酵性細菌や酵母菌の耐熱性遺伝子解析を通して明らかとなった個々の微生物の、さらにはこれらに共通する耐熱性分子機構について紹介する。

大腸菌の耐熱性遺伝子解析

大腸菌は中温菌のなかでも比較的高い温度で生育でき、47℃付近に高温側の生育限界温度をもつ。この性質は、恒温動物内に生息する生活環の獲得と関連しているのかもしれない。このように比較的耐熱性が強いことやモデル生物として種々の網羅的解析用のライブラリーがそろっていることから、大腸菌は耐熱性分子機構の解析に好適である。

われわれは、大腸菌の一遺伝子破壊株ライブラリー⁽⁴⁾の47℃での網羅的探索により、72個の耐熱性遺伝子を抽出した。先に、われわれは51個の耐熱性遺伝子を報告⁽⁵⁾しているが、その後の詳細な解析から21遺伝子を耐熱性遺伝子として追加した（村田ら、未発表）。驚いたことに、これらのなかには、*dnaK*, *dnaJ*, *degP*以外の多くの熱ショック遺伝子が含まれておらず、膜構造維持に必要な膜タンパク質やDNA修復、翻訳調節、細胞分裂等の細胞の基本的機能にかかわる遺伝子群が含まれていた（表1）。また、個々の耐熱性遺伝子の破壊は45～47℃の生育に影響するがその温度範囲より低い温度での生育にはほとんど影響しないことがわかった。このように大腸菌では、耐熱性遺伝子は生育限界温度付近の2～3℃の境界領域に必要であり、そのほとんどが熱ショック遺伝子とは異なることが明らかとなった。おそらく、生育限界温度で恒常的に増殖するために必要な遺伝子

表1 ■ 耐熱性遺伝子の分類とその数

分類	酵母	大腸菌	酢酸菌	ザイモモナス菌
エネルギー代謝	1	22	2	4
膜の安定化・膜タンパク質	15 ^a	19	6	10
DNA修復	3	6	0	3
tRNA修飾	0	9	0	1
タンパク質品質管理	4	4	5	2
翻訳調節	2	4	1	1
細胞分裂	10 ^b	3	3	1
転写調節	15	0	1	2
酸化ストレス応答	1	0	1	1
機能未知	1	5	5	5

^a ミトコンドリア、液胞、小胞体等の膜関連遺伝子。

^b 細胞分裂周期と形態形成の関連遺伝子。

図1 ■ 大腸菌のリボ多糖合成および硫黄リレー系
アンダーラインは大腸菌の耐熱性遺伝子産物を示す。

セットは、一時的な温度上昇への対応に必要な遺伝子とは異なるということであろう。ただし、生育限界温度付近でのトランスクリプトーム解析を行った結果、必須遺伝子であり熱ショック遺伝子の *groEL* の発現が上昇していた。GroELは、大腸菌のHSP60として一部の新生タンパク質の構造形成や品質管理に必須であり⁽⁶⁾、生育限界温度でも重要な役割を果たしている可能性がある。GroEL, DnaK, DnaJはタンパク質のフォールディングに関与する熱ショックタンパク質であることから、生育限界温度でタンパク質のミスフォールディングが増加することを示唆している。なお、GroELはDnaKやDnaJとは異なり、低い温度でも不可欠である。

次に、大腸菌で見いだされたこれらの耐熱性遺伝子の、中温菌におけるオルソログの分布を調べた。その結果、多くのオルソログが中温菌に広く分布していることが判明した⁽³⁾。特に、腸内細菌科の *Salmonella enterica*, *Yersinia pestis*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* などではほとんどのオルソログが存在し、これらが⁽³⁾大腸菌を含む腸内細菌の比較的高温での生存を可能にしていると考えられる。また、耐熱性遺伝子のなかでもリボ多糖の糖鎖合成に関与する酵素系の遺伝子群や硫黄リレー系でのtRNAの修飾に関与する酵素系の遺伝子群は(図1)、好熱菌の一部に存在しており、これらが水平伝播された可能性が考えられる。

また、興味深いことに、耐熱性遺伝子破壊株のうち37株は20mM Mg²⁺の添加によって限界温度での生育が回復した⁽³⁾。そのうち、22株の耐熱性遺伝子産物が膜結合タンパク質や膜と相互作用するタンパク質であった。また、0.5mM過酸化水素添加実験の結果、約60%の耐熱性遺伝子破壊株が30℃で感受性になっていた。さらに、後述するように生育限界温度付近では活性酸素

種(ROS)が急激に蓄積した。これらの結果は、多くの耐熱性遺伝子が酸化ストレスによって起こるダメージを回避するために存在している可能性を示唆している。この点は、上記のDNA修復に関与する酵素やRNA修飾にかかわる酵素の遺伝子群の必要性とも合致するように思われる。一方、酸化ストレス応答遺伝子が耐熱性遺伝子としてリストアップされなかった。これは、一見矛盾しているようであるが、同様な作用をする遺伝子が複数存在する大腸菌のロバスト性を反映しているかもしれない。

耐熱性 *Acetobacter* 属酢酸菌の耐熱性遺伝子の解析

酢酸菌の生育限界温度は酢酸菌属によってさまざまに異なる。*Gluconobacter* 属および *Gluconacetobacter* 属酢酸菌は一般に30~33℃であるのに対し、*Acetobacter* 属酢酸菌は比較的高く一般に35~37℃になる。われわれは、これまでタイの研究者との共同研究を通じて、多くの耐熱性酢酸菌を分離してきた。なかでも、40℃付近で生育が可能な一群が *Acetobacter* 属に見つかり、その代表が酢酸発酵能の強い *Acetobacter pasteurianus* SKU1108と菌膜多糖の生成能が高い *Acetobacter tropicalis* SKU1100であった。当初、それぞれ *Acetobacter lovaniensis* SKU1108⁽⁶⁾ および *Acetobacter* sp. SKU1100⁽⁷⁾ として公表したが、現在では16S rRNA配列に基づいて分類し直している。

これらの耐熱性機構を解明するため、接合伝達能の高い *A. tropicalis* SKU1100を用いてTn10を用いるトランスポゾン挿入による遺伝子破壊⁽⁸⁾を行った。その結果、*A. tropicalis* SKU1100から4,000株程度の破壊株を分離し、それらのなかからドットスポット・テスト、さらに

図2 ■ *A. tropicalis* SKU1100の耐熱性遺伝子の相補・破壊による確認実験例

A: Glutamine synthase adenylyltransferase (Gln) の2つの Tn10 変異箇所; B: Tn10 変異株 (*gln::Tn*) とその相補株 (*gln::Tn (gln)*) との生育比較 (*はvector control)(YPG培地±1% ethanol); C: Xanthine dehydrogenaseの Tn10 変異部位 (*xdhA*) と遺伝子破壊部位 (*xdhB*); D: Tn10 変異株 (*xdhA::Tn*) と Km 破壊株 (*xdhB::Km*) の生育比較 (ポテト培地±1% ethanol)。

は液体振とう培養を行って、39°Cで生育不能や生育不良を示す33株の高温感受性株を得た。これら高温感受性株のトランスポゾン挿入部位をTAIL-PCR法を用いて解析し、重複を含めて24個の耐熱性に関与する挿入部位を特定した⁽⁹⁾。さらに、SKU1100株のドラフトゲノム解析を行い、そのゲノム情報を基に、その24個の破壊遺伝子個々の遺伝子構成を明らかにするとともに、遺伝子クローニング、相補実験および（もしくは）遺伝子破壊を行った。たとえば、ゲノム上に単一遺伝子として存在するグルタミンシンターゼアデニリルトランスフェラーゼ (Glutamine-synthetase adenylyltransferase) (図2A) の場合、その構造遺伝子の3'末端近傍に Tn10 が挿入された2つの破壊株 (*gln::Tn10*) が得られた。これらの破壊株は、エタノール存在下、37°Cでその生育が低下し、39°Cでは、エタノールの有無にかかわらず、完全に生育できなくなっていた。しかし、その破壊株は *gln* 遺伝子相補によって、野生株と同様の生育を示すことが示された (図2B)。一方、オペロンを形成しているキサンチンデヒドロゲナーゼ (Xanthine dehydrogenase) (図2C, *xdhABC*) の場合、*xdhA* に Tn10 が挿入された破壊株 (*xdhA::Tn10*) が得られ、それはエタノール有無にかかわらず37°Cでの生育が低下し、39°Cで全く生育できなくなったが、オペロン上の *xdhB* 遺伝子破壊 (*xdhB::Km*) を行くと、*xdhA::Tn10* 株と同等もしくはより強い生育阻害が観察された (図2D)。このよ

うにして、相補実験によって12個の遺伝子の耐熱性への関与を確認し、加えて遺伝子破壊に基づいて、5個の遺伝子の耐熱性への関与を確認できた (表2)。また、これら24個の遺伝子のうち、19個については、その相同性検索および文献データに基づく機能予測によって、ストレス応答・N代謝・品質管理、細胞壁・細胞膜合成、細胞分裂、膜輸送、転写・翻訳、補因子合成にそれぞれ機能分類された (表2)。なお、面白いことに、これらの破壊株の酢酸耐性への影響を見ると、24の高温感受性株のうち、13株が1%酢酸に感受性であり、特に膜合成と膜輸送に関与する破壊株はすべて酢酸感受性を示したことから、膜構造の安定性と耐熱性および酢酸耐性が関連性をもつことも示唆されている。

これらの耐熱性遺伝子のうち、強い高温感受性と酢酸感受性を示した Na^+/H^+ antiporter をコードする遺伝子の破壊株については、さらに詳細な解析を行った⁽¹⁰⁾。まず、この遺伝子破壊株の生育に及ぼす Na^+ および K^+ の影響を調べたところ、50~100mM という比較的高濃度の Na^+ が培地中に存在するとこの破壊株の高温生育が可能になる一方で、100mM を超える高濃度の K^+ が存在すると逆に常温でも生育できなくなることがわかった。さらに野生株と破壊株から反転膜小胞を調製して、イオン輸送活性を解析したところ、このアンチポーターは、中性域で Na^+ だけでなく K^+ に依存した H^+ 対向輸送能をもつこと、またアルカリ性領域で機能する別の

表2 ■ *A. tropicalis* SKU1100 高温感受性を示すトランスポゾン挿入遺伝子群

遺伝子番号*	予測機能	機能	遺伝子構成	分析結果**
ATPR_1619 (4)	Serine protease, DegP	ストレス応答・N代謝 (タンパク品質管理)	Single	Com
ATPR_0429 (1)	Zn-Metalloprotease		Operon	Com
ATPR_2837 (1)	Xanthine dehydrogenase		Operon	Km
ATPR_2097 (2)	Glutamine-synthetase adenylyltransferase		Single	Com
ATPR_0143 (1)	Lysyl tRNA synthase		Operon	Com/Km, Ac+
ATPR_3088 (1)	Putative small heat shock protein, HspA		Single	
ATPR_2801 (1)	Asparagine synthase	細胞壁・膜合成	Operon	
ATPR_0874 (1)	3-Phospho glycerate dehydrogenase		Operon	Com, Ac+
ATPR_1188 (2)	Hopene-associated glycosyltransferase		Operon	Com/Km, Ac+
ATPR_3151 (2)	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase		Single	Ac+
ATPR_1965 (1)	DNA methyltransferase	細胞分裂	Operon	Com, Ac+
ATPR_1424 (3)	Chromosome segregation		Operon	
ATPR_0029 (1)	Septum inhibitor, MinC		Operon	
ATPR_0071 (1)	Na ⁺ /H ⁺ Antiporter	膜輸送	Single	Com/Km, Ac+
ATPR_0609 (1)	ABC transporter, binding protein		Single	Com/Km, Ac+
ATPR_0450 (1)	GTPase, lepA	転写・翻訳	Operon	
ATPR_2218 (1)	RNA polymerase ECF-type sigma factor		Operon	Ac+
ATPR_0022 (1)	Siroheme synthase	補因子合成	Single	Com, Ac+
ATPR_1364 (1)	Flavodoxin/nitric oxide synthase		Single	Ac+
ATPR_0036 (2)	Hypothetical protein	未知機能	Operon	Com
ATPR_0586 (1)	Hypothetical protein		Single	Com, Ac+
ATPR_0443 (1)	Hypothetical protein		Single	Ac+
ATPR_0162 (1)	Hypothetical protein		Operon	
ATPR_2096 (1)	Hypothetical protein		Single	Ac+

*() 内は取得破壊株の数. ** Com: 相補実験済み; Km: 破壊実験済み; Ac+: 酢酸感受性株 (30°C).

Na⁺/H⁺アンチポーターが存在することが明らかとなった. これらの結果から, 本菌の高温下での生育には, このNa⁺/H⁺ antiporterによる細胞内のK⁺濃度の制御が重要であることが明らかとなっている.

A. tropicalis SKU1100に見いだされた24個の耐熱性遺伝子を調べてみると, 大腸菌に見られたような水平伝播によって獲得されたものではなく, すべて*Acetobacter*属酢酸菌に広く分布し, 系統進化しているものであることがわかった. 一方, これらの遺伝子群のオルソログがたとえば*Gluconobacter*属や*Gluconacetobacter*属などのほかの酢酸菌属では欠落しているものもあり(松谷ら, 未発表), これらの遺伝子群が*Acetobacter*属菌が酢酸菌のなかで比較的高い耐熱性をもつことを説明するものと考えられる.

本解説の耐熱性を賦与する本質的な遺伝子群を推定するため, 網羅的な遺伝子発現の比較解析を行った. 対象とする菌には, 酢酸菌としては比較的耐熱性である*A. pasteurianus*の株から, 30°C付近が最適増殖温度で38°Cが生育限界温度であり, 菌膜形成能をもつ*A. pasteurianus* IFO3283-32と, その株から派生した菌膜形成能を失ったIFO3283-01を用いた. 両菌株ともその完全ゲノ

ム配列をすでに決定している⁽¹¹⁾. 比較解析には, それぞれの菌株を30°Cと37°Cで培養し, 全RNAを次世代シーケンサーで解析し, 遺伝子発現を比較した. 発現解析には統計解析に加え, 代謝マップ上での機能解析などを行った. これらの解析のうち遺伝子発現変化を可視化した解析結果を図3に示す.

解析対象とした酢酸菌の3,049遺伝子から, 30°Cでの培養と37°Cでの培養で, 2株に共通して発現量が有意に変動している108遺伝子を抽出した(詳しい遺伝子の抽出方法は図3の説明を参照). そのうち37°Cで高発現している69遺伝子(平均値+3SD以上)を機能分類すると, 膜タンパク質遺伝子と機能不明遺伝子がそれぞれ22遺伝子と最多であり, ほかに代謝関連遺伝子6個, 転写因子遺伝子5個, CRISPR遺伝子5個, トランスポゾン関連遺伝子4個, 熱ショックタンパク質遺伝子3個, そして金属の酸化酵素をコードする遺伝子2個であった. 膜タンパク質をコードする遺伝子のうち, 金属(特に鉄)の取り込みや排出にかかわる酵素の遺伝子が11個あり, また金属の酸化酵素に関連する遺伝子発現の上昇という現象を考え合わせると, 細胞内金属イオンの耐熱性への重要な関与が推測される. 本稿のほかの章でも

図3 ■ *A. pasteurianus*の増殖温度による比較トランスクリプトーム解析

横軸には、30°Cと37°Cで培養した2株（IFO3283-32とIFO3283-01）について、それぞれの遺伝子の発現量（ORF/KM@30°CとORF/KM@37°C）の対数値を加算した値を示す。縦軸には、37°C培養での各遺伝子の発現量の対数値から30°Cでの値を減算した値を示す。各遺伝子の遺伝子発現プロファイルは黒い点で示されており、横軸右のほうにある点は発現量の大きい遺伝子であることを、縦軸上のほうにある点は37°Cで培養するほうが30°Cでの培養よりも遺伝子の発現が高かったことを示している。発現量の大きさごとで平均値と標準偏差を求めるために、横軸の0.1ごとに階層を設け、その階層に含まれる遺伝子群について縦軸の値の平均値および標準偏差を求めた。灰色の実線はその平均値の近似曲線を示す。また、2本の緑色の実線は横軸の各階層における平均値に標準偏差の3倍の値を加減（±3SD）した値の近似曲線である。解析した2株においてともにこの平均値±3SDを超えた遺伝子を、発現量が有意に変動した遺伝子とした。今回の実験では108個の遺伝子が抽出され、図中に黒色の楕円で示す。本トランスクリプトーム解析実験では、独立した培養を各菌で3回実施しRNAを調製し、cDNA調製後にrRNA由来cDNAを物理的に約90%排除した。タンパク質をコードする遺伝子の発現量を表現するために、得られた全リードからrRNA遺伝子オペロン領域にマップされるリードを計算機的に除外し、rRNA遺伝子以外のゲノム領域にマップされた総リード数を100万リードに補正し、かつ各遺伝子の長さを1,000塩基に補正した。独立して行った3回の実験結果を各遺伝子で平均し5を加えた値を各遺伝子のORF/KM値とした。その3回の実験結果の標準偏差は図中に示されていないが、おおむね平均値の10%以内であった。

Mg^{2+} と耐熱性の関係に触れているが、本菌も10mMの Mg^{2+} を培地へ添加することにより生育限界温度が1°C程度上昇した。このように、金属イオン代謝に関連した酵素や輸送系の遺伝子と Mg^{2+} の添加による耐熱性の強化の関係は今後の研究課題である。

耐熱性遺伝子と熱ショックタンパク質遺伝子の関係については、熱ショックタンパク質遺伝子の高発現が本酢酸菌においては耐熱性と関係する可能性もあるが、高温域での増殖に伴う遺伝子発現変化や変性タンパク質の蓄積に由来する結果である可能性もある。耐熱性を賦与する遺伝子に熱ショックタンパク質遺伝子も含まれるかどうかは研究の途上にあり、多重遺伝子破壊株の作成による解析などが必要である。一方、発現抑制された遺伝子の多くは中央代謝経路もしくは呼吸鎖の遺伝子であり、菌の増殖速度が低減したことによる間接的な影響なのか、それとも呼吸鎖の活性低減による活性酸素の発生低下がストレス回避および高温での安定増殖に関連するのか、さらにもっと本質的な意味をもつのか、現在のところ

不明である。

耐熱性ザイモナス菌の耐熱性遺伝子の解析

ザイモナス菌は、グラム陰性の通性嫌気性細菌であるが、糖の資化速度が速く、高いエタノール生産性を示す一方、低いバイオマス生産性、培養時の酸素供給が不必要であること、さらには比較的ゲノムが小さい（約2Mb）などの利点を有することから、次世代のバイオエタノール生産菌、そして物質生産の基盤株として注目されている^(12, 13)。われわれはこれらの特徴を活かし、さらに耐熱性を有する菌株を用いることで、高温下で高速な物質生産を可能にしようと考えている。これまでにザイモナス菌の耐熱性に関して、熱ショック遺伝子の導入⁽¹⁴⁾や各種変異処理による耐熱化の報告⁽¹²⁾はあるが、どのような遺伝子が耐熱性および耐熱化に寄与するかを解析したものは少ない。このうち、薬剤耐性株の取得によって耐熱化した株において、NADH脱水素酵素遺伝

表3 ■ 高温で増殖不能を示す酵母遺伝子破壊株

破壊遺伝子座名	遺伝子名	増殖不能温度 (°C)	タンパク質機能	分類
YFR036W	CDC26	33	Ubiquitin-protein ligase	タンパク質分解・品質管理
YER068W	MOT2	35	Ubiquitin-protein ligase	
YBR173C	UMP1	38	Proteasome activator	
YML094C-A	GIM5*	38	Cochaperone prefoldin complex	
YLR315W	NKP2	33	Central kinetochore protein	細胞分裂周期
YGR188C	BUB1	38	Protein kinase	
YOR026W	BUB3	38	Kinetochore checkpoint WD40 repeat protein	
YKR082W	NUP133	38	Nuclear pore complex protein	
YMR284W	YKU70	38	Subunit of the telomeric Ku complex	DNA 修復
YKL113C	RAD27	38	5' to 3' Exonuclease	
YJL115W	ASF1	38	Nucleosome assembly factor	
YOR035C	SHE4	35	Regulate myosin function	形態形成
YBR200W	BEM1	38	SH3-Domain protein	
YDR388W	RVS167	38	Actin-associated protein	
YBL007C	SLA1	38	Cytoskeletal protein binding protein	
YLR338W	VRP1*	38	Proline-rich actin-associated protein	
YER016W	BIM1	38	Microtubule plus end-tracking protein	
YDR364C	CDC40	33	Pre-mRNA splicing factor	RNA 関連機能
YOR001W	RRP6	38	3'-5' Exoribonuclease	
YDR433W	NPL3*	38	RNA-binding protein	
YJL176C	SWI3	38	SWI/SNF chromatin remodeling complex	
YNL236W	SIN4	38	RNA polymerase II mediator complex	
YDR293C	SSD1	38	Translational repressor	
YPR101W	SNT309	38	Essential for mRNA splicing	
YHR041C	SRB2	38	RNA polymerase II mediator complex	
YCR077C	PAT1	38	mRNA-decapping factor	
YBR065C	ECM2	38	Pre-mRNA splicing factor	
YIR005W	IST3	38	Component of the U2 snRNP	
YBL093C	ROX3	38	RNA polymerase II mediator complex	
YGR180C	RNR4	38	Ribonucleotide-diphosphate reductase	
YLR399C	BDF1	38	Protein involved in transcription initiation	
YGL071W	AFT1	38	Transcription factor involved in iron utilization	
YNL147W	LSM7	38	Lsm (like Sm) protein	
YPR163C	TIF3	38	Translation initiation factor	
YDL113C	ATG20	33	Cytoplasm to vacuole targeting	液胞・小胞体等膜機能
YDR136C	VPS61	38	Vacuolar sorting protein	
YEL027W	VMA3	38	Vacuolar membrane ATPase	
YER083C	GET2	38	Protein insertion into the ER membrane	
YLR417W	VPS36	38	Component of the ESCRT-II complex	
YLR242C	ARV1	38	Cortical ER protein	
YLR262C	YPT6	38	Rab family GTPase	
YLR148W	PEP3	38	Vacuolar membrane protein	
YCR044C	PER1	38	Protein processing in the ER	
YBR171W	SEC66	38	Non-essential subunit of Sec63 complex	
YGL223C	COG1	38	Conserved oligomeric Golgi complex	
YMR060C	SAM37	35	Translocase of outer mitochondrial membrane	ミトコンドリア機能
YNL055C	POR1	35	Mitochondrial porin	
YOL076W	MDM20	35	Mitochondrial distribution and morphology	
YNL121C	TOM70	38	Translocase of outer mitochondrial membrane	
YEL029C	BUD16	38	Putative pyridoxal kinase	代謝
YJR104C	SOD1	38	Cytosolic copper-zinc superoxide dismutase	酸化ストレス
YJR056C	YJR056C	38	Unknown	機能未知

* 相補鎖に重複していた遺伝子名を示す。

子に変異が確認された例⁽¹⁵⁾がある。われわれも、シトクロム *c* ペルオキシダーゼ遺伝子の破壊株が耐熱性を低下することを報告した⁽¹⁶⁾が、大腸菌⁽³⁾や酢酸菌⁽⁹⁾と同様に包括的な耐熱性の理解が重要であると考えた。そこで、ザイモナス菌の耐熱性遺伝子を探索するため、耐熱性を示す *Zymomonas mobilis* TISTR548 を親株としてトランスポゾン Tn10 挿入による遺伝子破壊株ライブラリーを作製し、生育限界温度である 39.5°C において、固体培地での生育、液体培地での生育、液体培養による生育速度比較の3段階のスクリーニングにより、高温感受性株を 67 株取得した。それぞれの感受性株の Tn10 挿入部位を TAIL-PCR と DNA シークエンスによって特定し、30 個の耐熱性に関与する遺伝子を同定した (表1)。また、これら遺伝子の下流の遺伝子の転写を RT-PCR により親株のものと比較し、遺伝子破壊による極性効果がないことも確認した。これらの遺伝子を、UniProt および KEGG データベースの情報を基に機能分類したところ、エネルギー代謝、膜の安定化・膜タンパク質、DNA 修復、tRNA 修飾、タンパク質品質管理、翻訳調節、細胞分裂、転写調節、酸化ストレス応答、機能未知に分類することができた (表1)。なお、これら遺伝子には生育必須遺伝子は含まれていない。さらに、耐熱性とその他の環境ストレス耐性との関連性の有無を調べるために、高温感受性株に対する培地への 20mM Mg^{2+} 添加効果、あるいは 2% エタノール存在下での高温感受性を調べたところ、グリコシルトランスフェラーゼなどの膜の安定化関連遺伝子変異株は Mg^{2+} 添加により生育が回復したことから、 Mg^{2+} による膜の安定化効果が示唆された。さらに、エタノールに対しては、たとえば、スクアレンホペンサイクレースといった膜の安定化にかかわる遺伝子破壊株で感受性が高いことが明らかとなった。なお、 Mg^{2+} の培地への添加効果については、ザイモナス菌で耐熱化効果があることが報告されている⁽¹⁷⁾。また、ほかの菌株ではあるがサルモネラ菌において Mg^{2+} トランスポーターの量産化による耐熱化が明らかになっており、 Mg^{2+} の耐熱性への効果としては、タンパク質や細胞膜の安定化もしくは酸化ストレスの抑制によるものであるか、 Mg^{2+} が細胞内のシグナル分子として働き耐熱性を誘導するためと考えられている⁽¹⁸⁾。今回の結果やほかの微生物の研究を考慮すると、膜の安定化はザイモナス菌における耐熱性に重要であると考えられる。

酵母菌の耐熱性遺伝子解析

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、パンやお酒の発酵を担う微生物であり、また、モデル生物として先進的な生命機能解析の対象でもあるので数多くの情報が蓄積している。お酒の発酵は低温 (10~15°C) で行われ、研究室の実験では 30°C が培養温度となり、バイオエタノール生産はできるだけ高い温度、通常 30~35°C で行われる。したがって、一般には、*S. cerevisiae* では 38°C ですら高温となる。*S. cerevisiae* においては、すべての非必須遺伝子をそれぞれ破壊した遺伝子破壊株ライブラリーがあり⁽¹⁹⁾、これを用いると、どの遺伝子が *S. cerevisiae* にとっての高温 (33~38°C) での増殖に必要なものかわかる。2 倍体での遺伝子破壊株 4,792 株を 38°C にて YPD 固体培地で増殖させ、増殖できない 238 株を得、再チェックを繰り返すとともに、33°C、35°C、38°C、40°C での増殖を観察することで、最終的に増殖に関して 125 株の高温感受性株を選抜した。このうち、33~38°C で増殖ができない株をその機能分類とともに表3に示した。

まず、大腸菌の遺伝子破壊株ライブラリーによる網羅的解析結果とも一致するのは、熱ショック遺伝子はほとんど現れてこないことである。すなわち、原核微生物でも真核微生物でも一時的な熱ショック耐性とこのような高温条件での増殖には異なるメカニズムで対応しているらしい。ただし、タンパク質分解に関与するユビキチン・プロテアソームに関連する遺伝子はいくつか抽出されたので、変性タンパク質への対応自体は、耐熱性には重要な意味をもつと考えられる。

次に興味深いことは、細胞分裂周期・形態形成 (細胞分裂)、DNA 修復、RNA 関連機能 (tRNA 修飾と転写調節) などの遺伝子群が大腸菌の場合と同じように含まれていることがわかった (表1)。これらの結果から、種を越えて普遍的な耐熱性の分子メカニズムの存在を考えることができる。ただし、注意しなければならないことが、生存に必須な機能の脆弱化と高温増殖にのみ必要な機能を見分けることが難しいことである。*S. cerevisiae* には必須遺伝子が 1,000 個程度ある。必須遺伝子が関与する機能の低下は高温での増殖や発酵に影響を与えるはずである。破壊により生存に必須な機能を低下させる遺伝子が耐熱性を賦与する遺伝子となるのかについては、懐疑的な態度が必要であろう。たとえば、表3で分類した細胞分裂周期、DNA 修復、形態形成、転写・スプライシングなどの RNA 関連機能などは複数のタンパク質の複雑な相互作用を必要とする機能群である。関連する

図4 ■ 酵母培養条件による耐熱性の変化

YPD系培地で好気は2日、嫌気は4日培養した。

1 遺伝子の欠損だけでもそれらの機能低下が起こり、高温での増殖の低下を引き起こしたとも考えられる。

さらに複雑なことに、培養環境を変化させても破壊株の耐熱性の程度が変化することを見いだした (図4)。*S. cerevisiae* の高温増殖テストを通常の培養 (好気条件) とアネロパックで包んだ嫌気培養を行ってみると *PER1* (小胞体においてGPIアンカー形成に関与する遺伝子) 破壊株では嫌気条件下、38°Cでの増殖がさらに弱くなり、一方、*AFT1* (鉄代謝応答性転写制御因子遺伝子) や *SOD1* (スーパーオキシドディスムターゼ遺伝子) 破壊では嫌気条件で耐熱性が回復した。しかし、*SEC66* (小胞体へのトランスロケーションに関与する遺伝子) 破壊ではどちらの条件でも同程度の感受性であった。好気と嫌気ではミトコンドリア機能や代謝経路に変化があるはずなので、これらと耐熱性に何らかの関連が考えられる。たとえば、*Sod1* はROSを消去し酸化ストレス耐性を担うので、高温の好気呼吸時に発生するROSに対応するとすれば、ROSが少ないと考えられる嫌気環境では *SOD1* 破壊による耐熱性への影響が少なくなると説明することはできる。

さて、結局のところ何が耐熱性を支える主要な遺伝子であろうか。特に、本解説での耐熱性微生物が示す耐熱性は、必須機能のロバスト性 (頑強さ) がもたらすものなのか、それとも、特別に獲得した何らかの耐熱性機構によるものか、どちらを考えればよいのであろうか。

高温エタノール発酵ができる耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* を研究対象にすると少しそのヒントが現れてくる⁽²⁰⁾。*S. cerevisiae* は42°C程度が生育限界温度であるのに対して *K. marxianus* は50°C弱である。*K. marxianus* の多くのタンパク質は、ゲノム解析によって *S. cerevisiae* のものと相同性を示すことがわかってきた⁽²¹⁾。また、*K. marxianus* の遺伝子変異を *S. cerevisiae* の遺伝子で相補させることが、プロモータ変換などをしなくても、試みた栄養要求性に関する遺伝子のほとんどで可能であった⁽²²⁾。つまり、両酵母菌は、多くの遺伝子の機能やその発現能力に本質的な差がないほどの近縁

種と考えられる。増殖能力において、5~10°C程度の耐熱性の差を細胞分裂周期や形態形成などの複雑な必須機能全体のロバスト性の進化、言い換えれば相互作用を担う複数の遺伝子の同時進化で答えることは難しいのではないかと感じている。つまり、耐熱性獲得には、単純な化学的な仕組み、たとえば膜機能の安定化のようなものがあるのではないかとこの仮説を考えている。

生理的温度での重要な化学的变化に脂質二分子膜の構造をゲルから液晶へ変化させる相転移温度がある。相転移温度は脂質分子種で異なるが⁽²³⁾、温度による膜流動性の変化がそこで機能する膜タンパク質の働きと連携して、生物の生理学的温度を規定している可能性は高い。酵母菌でも多くの膜系遺伝子の破壊が高温感受性を示し、ほかの微生物でも見つかった (表1~3)。膜系遺伝子を含め、耐熱性を賦与する遺伝子を明らかにすることが長く課せられたわれわれの課題となっている。*K. marxianus* の全遺伝子の整理とその発現解析、遺伝子破壊や導入、および交配から胞子形成など、モデル生物 *S. cerevisiae* に匹敵する分子遺伝学的解析系はほぼ完備できた⁽²⁴⁾。耐熱性酵母を使うことで、耐熱性機構解明に近づけると期待している。

耐熱性機構の普遍性

大腸菌のトランスクリプトーム解析の結果⁽³⁾、その生育限界温度付近では、いくつかの耐熱性遺伝子の発現が低下することが判明した。これらの遺伝子発現の減少が限界温度を決定しているかもしれない。一方で、限界温度近辺では細胞内のROSの蓄積量が急激に増加し、その時期に遺伝子発現に大きな変化が起こり、僅か1°Cの違いでも発現変動値や変動する遺伝子が大きく異なることがわかった (村田ら、未発表)。仮にROS蓄積量が直接的にあるいは間接的に全体的な発現変動を引き起こしているとすると、ROS蓄積を抑制することによって生育限界温度が高まる可能性がある (図5)。この可能性を確かめるために *SodA* (スーパーオキシドディスムターゼ) あるいは *KatE* (カタラーゼ) 遺伝子をプラスミドで大腸菌に導入したところ、ROS蓄積量が抑制され、限界温度での生存率が増加した (村田ら、未発表)。

ROSは、主に種々のストレスによる膜の不安定化などによって呼吸鎖電子伝達系の脱水素酵素などから電子が漏れて、酸素へ移ることによって生じると考えられている⁽²⁵⁾。したがって、ROS抑制には十分なROS除去機能をもつか、酸素の存在量を下げるか、このような電子の漏れを最小限に保つための安定な膜構造をもつことに

図5 ■ 共通する耐熱性機構

よって達成されると思われる (図5). 膜構造の安定化に関連すると思われる耐熱性遺伝子が大腸菌, 酢酸菌, ギイモナス菌, 酵母菌で見いだされていることから (表1), 膜構造の安定化は一般的な耐熱性機構の一つと考えられる. しかし, 表1の分類「膜構造の安定化・膜タンパク質」の中にはトランスポーターやチャネルタンパク質も含まれている. それらは, 生育限界温度で特有な機能を発揮する場合と膜の構造タンパク質として膜の安定化に寄与する場合が考えられるが, 今のところ両者を区別することができていない.

一方で, ROSの蓄積はDNA, RNA, タンパク質, 脂質などに障害をもたらす. このような障害が生育限界温度を決定している可能性がある. 耐熱性遺伝子のなかに共通して, そのような障害を除くための, DNAやタンパク質の修復・除去系あるいはリボゾームの翻訳停止を抑制する因子などが見いだされている (表1, 図5).

おわりに

高温発酵系の構築には, 高温で安定に発酵できる耐熱性発酵微生物が必要である. 上記のように, いくつかの微生物を用いた解析から普遍的な耐熱性機構の存在がわかってきた. このことは, 遺伝子組換えによって耐熱化が図れる可能性を示している. 現在ではゲノム解析が容易となり, 耐熱化に欠けている遺伝子や遺伝子群を同定し, ほかの生物からそれらに相当する遺伝子を導入することによって耐熱化が図れると思われる. 一方で, 遺伝子組換え体が規則上使えないあるいは組換え体の管理が施設のにも経済的にも難しい場合にはより耐熱性の強い微生物の探索が必要である. あるいは, Mg^{2+} のような比較的安価な添加物によってある程度の耐熱化を達成できるかもしれない.

一方で, 当然のことであるが, 発酵食品や飲料品の場

合には発酵産物の味や匂いも重要なファクターとなる. また, 発酵原料や発酵産物によっては温度耐性だけでなく, 発酵菌にとって, 酸やアルカリあるいはほかの生育阻害物質に対する耐性が必要となる. したがって, 高温発酵には目的に応じた耐熱性微生物の開発が不可欠となる.

蛇足になるが, 耐熱性の分子機構の理解は, 冒頭に紹介した食品業界などでの品質保持に悪影響を及ぼす混入菌の問題解決にも役立つかもしれない. もし, それらの悪玉菌が耐熱性発酵微生物と同様な耐熱性機構をもっていれば, その耐熱性機構を弱める処理を新たに考案できると期待される.

謝辞: 本研究は, JSPS-NRCT拠点大学事業 (1998~2007年度) で見いだされた耐熱性発酵微生物をきっかけとして, JSPS-NRCTアジア研究教育拠点事業 (2008~2012年度), JSPS研究拠点形成事業 (2014年度~) を通じて発展してきたものである. 特に, 耐熱性機構の研究については, 生研センター基礎研究推進事業 (2006~2010年度) や戦略的創造研究推進事業 (ALCA) (2011年度~) の支援を受けて進めてきた. また, 耐熱性微生物を用いた高温発酵試験を科学技術戦略推進費 (MEXT-ARDA) (2010~2012年度) として実施した. これらの事業の支援と本研究に携わった研究者や学生に対して感謝の意を表したい.

文献

- 1) 松下一信, 赤田倫治, 山田 守: 化学と生物, **46**, 472 (2008).
- 2) 村田正之, 高坂智之, サビトリー・リムトン, 山田 守: ケミカルエンジニアリング, **66**, 1(2015).
- 3) M. Murata, H. Fujimoto, K. Nishimura, K. Charoensuk, H. Nagamitsu, S. Raina, T. Kosaka, T. Oshima, N. Ogasawara & M. Yamada: *PLoS ONE*, **6**, e20063 (2011).
- 4) T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner & H. Mori: *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 1 (2006).
- 5) N. Kusakawa, T. Yura, C. Ueguchi & K. Ito: *EMBO J.*, **8**, 3517 (1989).
- 6) A. Saeki, G. Theeragool, K. Matsushita, H. Toyama, N. Lotong & O. Adachi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 138 (1997).
- 7) S. Moonmangmee, H. Toyama, O. Adachi, G. Theeragool, N. Lotong & K. Matsushita: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 777 (2002).
- 8) A. Deeksa, S. Moonmangmee, H. Toyama, M. Yamada, O. Adachi & K. Matsushita: *Microbiology*, **151**, 4111 (2005).
- 9) W. Soemphol, A. Deeksa, M. Matsutani, T. Yakushi, H. Toyama, O. Adachi, M. Yamada & K. Matsushita: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1921 (2011).
- 10) W. Soemphol, M. Tatsuno, T. Okada, M. Matsutani, N. Kataoka, T. Yakushi & K. Matsushita: *J. Biotechnol.*, **211**, 46 (2015).
- 11) Y. Azuma, A. Hosoyama, M. Matsutani, N. Furuya, H. Horikawa, T. Harada, H. Hirakawa, S. Kuhara, K. Matsushita, N. Fujita *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5768 (2009).
- 12) P. S. Panesar, S. S. Marwaha & J. F. Kennedy: *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 623 (2006).
- 13) M. X. He, B. Wu, H. Qin, Z. Y. Ruan, F. R. Tan, J. L. Wang, Z. X. Shui, L. C. Dai, Q. L. Zhu, K. Pan *et al.*:

- Biotechnol. Biofuels*, **7**, 101 (2014).
- 14) X. Zhang, T. Wang, W. Zhou, X. Jia & H. Wang: *Microb. Cell Fact.*, **12**, 41 (2013).
 - 15) T. Hayashi, T. Kato & K. Furukawa: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 5622 (2012).
 - 16) K. Charoensuk, A. Irie, N. Lertwattanasakul, K. Sootsuwan, P. Thanonkeo & M. Yamada: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 70 (2011).
 - 17) P. Thanonkeo, P. Laopaiboon, K. Sootsuwan & M. Yamada: *Biotechnology*, **6**, 112 (2007).
 - 18) K. O'Connor, S. A. Fletcher & L. N. Csonka: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 17522 (2009).
 - 19) A. H. Tong, M. Evangelista, A. B. Parsons, H. Xu, G. D. Bader, N. Pagé, M. Robinson, S. Raghizadeh, C. W. Hogue, H. Bussey *et al.*: *Science*, **294**, 2364 (2001).
 - 20) B. M. A. Abdel-Banat, H. Hoshida, A. Ano, S. Nonklang & R. Akada: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 861 (2010).
 - 21) N. Lertwattanasakul, T. Kosaka, A. Hosoyama, Y. Suzuki, N. Rodrussamee, M. Matsutani, M. Murata, N. Fujimoto, Suprayogi, K. Tsuchikane *et al.*: *Biotechnol. Biofuels*, **8**, 47 (2015).
 - 22) T. Yarimizu, S. Nonklang, J. Nakamura, S. Tokuda, T. Nakagawa, S. Lorreungsil, S. Sutthikhumpha, C. Pukahuta, T. Kitagawa, M. Nakamura *et al.*: *Yeast*, **30**, 485 (2013).
 - 23) 功刀 滋, 齊藤正治: “大学への橋渡し 生化学”, 化学同人, 2007.
 - 24) H. Hoshida, N. Murakami, A. Suzuki, R. Tamura, J. Asakawa, B. M. Abdel-Banat, S. Nonklang, M. Nakamura & R. Akada: *Yeast*, **31**, 29 (2014).
 - 25) B. W. Davies, M. A. Kohanski, L. A. Simmons, J. A. Winkler, J. J. Collins & G. C. Walker: *Mol. Cell*, **36**, 845 (2009).

プロフィール

山田 守 (Mamoru YAMADA)

＜略歴＞1978年山口大学農学部農芸化学科卒業／1984年同大学大学院医学系研究科博士課程修了／同年同大学医学部助手／1990年同大学農学部助教授／2001年同教授／2004年同大学医学系研究科教授，現在に至る＜研究テーマと抱負＞微生物における物質生産を含む生存戦略＜趣味＞スポーツをすること

赤田 倫治 (Rinji AKADA)

＜略歴＞1983年広島大学理学部生物学科卒業／1988年同大学大学院工学研究科博士課程修了／同年同大学遺伝子実験施設助手／1994年山口大学工学部応用化学工学科助教授／2006年同大学大学院医学系研究科教授，現在に至る＜研究テーマと抱負＞人に役立つ研究を酵母とヒト細胞で＜趣味＞木工，棚作り請負

高坂 智之 (Tomoyuki KOSAKA)

＜略歴＞1998年九州大学農学部農芸化学科卒業／2003年同大学大学院生物資源環境科学府博士課程修了／同年株式会社海洋バイオテクノロジー研究所研究員／2007年科学技術振興機構さきがけ専任研究者／2010年山口大学農学部助教，現在に至る＜研究テーマと抱負＞微生物の代謝制御とエネルギーの関係を理解する＜趣味＞音楽鑑賞

東 慶直 (Yoshinao AZUMA)

＜略歴＞1989年京都大学農学部農芸化学科卒業／同年ブリストルマイヤーズスクイブ東京研究所勤務／1994年総合研究大学院大学博士課程修了／同年カリフォルニア大学アーバイン校博士研究員／1997年産業総合研究所博士研究員／2001年山口大学医学部助手／2006年同講師／2010年近畿大学生理工学部准教授，現在に至る＜研究テーマと抱負＞微生物進化を理解するためのゲノム解析，特に細胞内共生に興味をもっています＜趣味＞子どもと遊ぶこと，園芸，旅行

星田 尚司 (Hisashi HOSHIDA)

＜略歴＞1993年広島大学総合科学部総合科学科卒業／1998年京都大学大学院人間・環境学研究科博士課程修了／同年名城大学総合研究所特別研究員／1999年山口大学工学部応用化学科助手／2010年同大学大学院医学系研究科准教授，現在に至る＜研究テーマと抱負＞耐熱性酵母を用いた耐熱性機構の解明や物質生産＜趣味＞野菜作り，スノーボード

松下 一信 (Kazunobu MATSUSHITA)

＜略歴＞1971年山口大学農学部農芸化学科卒業／1976年名古屋大学大学院農学研究科博士課程修了／同年山口大学農学部助手／1990年助教授／1995年同教授／2013年同教授（特命），現在に至る＜研究テーマと抱負＞酢酸菌の機能進化，耐熱性酢酸菌の高温発酵への利用＜趣味＞野球をする，古代史を読む

Copyright © 2015 公益社団法人日本農芸化学会

DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.53.763