OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Study of amino-acid crystal fermentation : Biochemical analysis of stress responses of Escherichia coli in a model culture system and an improvement of the fermentation process
Author(s)	奥谷, 聡志
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52276
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式3

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　奥谷　聡志　）	
論文題名	Study of amino-acid crystal fermentation: Biochemical analysis of stress responses of *Escherichia coli* in a model culture system and an improvement of the fermentation process （アミノ酸晶析発酵に関する研究：モデル培養系における大腸菌のストレス応答の生化学的解析と発酵プロセスの改良）

論文内容の要旨

バクテリアは、その生存、増殖の為、様々な温度やpH、栄養源、酸素、浸透圧などの外環境の変化を感知し、それらの変化に適切に対応する機能を有している。本研究ではアミノ酸晶析発酵におけるバクテリアへの結晶による物理的・機械的なストレスを対象として、生理的・生化学的なストレス応答解析を実施した。アミノ酸晶析発酵とは、発酵培養液中にアミノ酸結晶を析出せしめる培養法のことで、発酵菌は培養液中で結晶とともに攪拌されることで、菌体量低下や生産活性の低下など結晶によるストレスの影響が観察されている。

①　　モデル培養系の構築とトランスクリプトーム解析

バクテリアへの結晶ストレス応答を解析するため、まずアミノ酸結晶と類似しているポリ塩化ビニル粒子を用いたアミノ酸晶析発酵のモデル培養系を構築した。このモデル培養系を*E. coli*のストレス応答にて評価したところ、アミノ酸晶析発酵と同等の粒子量で、同レベルの菌体量低下が認められ、モデル培養系として成立することを確認した。このモデル培養系にて*E. coli*のストレス応答を解析したところ、糖の取り込み速度の上昇と菌体内ATP濃度の増加が認められた。バクテリアは結晶によるストレスを感知し、積極的な代謝やエネルギー生産の応答をしていると考えられた。そこで、このストレス応答の全容を解析するため、トランスクリプトーム解析を実施した。その結果、エネルギー生産に重要な解糖系やTCAサイクルを構成する遺伝子群の顕著な転写レベル上昇が認められた。また、結晶ストレス特徴的にFe-S cluster構築に関与する遺伝子の転写レベルの上昇が明らかとなった。Fe-S clusterを保有する酵素は、*E. coli*の生存及びアミノ酸生産にとって非常に重要であることから、Fe-S clusterに着目したストレスの応答解析を実施した。

②　　Fe-S cluster構築タンパク質のストレス応答

モデル培養系による結晶ストレス応答解析により、活性酸素種(ROS)の発生量増加とFe-S cluster保有酵素の活性低下を見出した。ストレス環境下ではROSによりFe-S clusterが破壊され、Fe-S cluster構築系が上昇しFe-S cluster酵素の活性低下を一定レベルに維持していると示唆された。Fe-S cluster構築に関与する構成タンパク質の発現量をそれぞれ特異的な抗体を用いて免疫学的手法による解析をしたところ、多くはストレスによる顕著な変化は認められなかったが、HscAに5~10 kDa短い新規分子種(HscA*)の発現を新たに発見した。また、N末端もしくはC末端にHis-tagを付与したHscAを用いた解析により、このHscA*はN末端が切断された構造であることを明らかにした。次にHscAの相同性タンパク質で、広くストレス応答に関与することで知られる分子シャペロンDnaKについて結晶ストレス応答を評価したところ、HscAのような有意な応答は認められなかったことから、HscA*の増加は結晶ストレス特異的な現象であり、このストレス環境下でFe-S clusterの再構築に関わっていると考えられた。そこでHscA過剰発現株を構築し、Fe-S cluster保有酵素の活性を測定したところ、ストレス環境下でのみ顕著に酵素活性が上昇することを見出した。通常環境下では有意な変化は認められなかったことから、HscA*がストレス環境下でのFe-S clusterの構築に強く寄与していることが示唆された。

③　　発酵プロセスの改良による結晶によるストレス緩和

結晶ストレスは菌体に対する結晶の接触頻度に大きく影響することから、接触頻度を減らすことでストレスが緩和するのではないかと考え、結晶粒径を大きくし、結晶数を減らす検討を実施した。疎水性アミノ酸の結晶の成長を促すことで知られるメチルセルロース(MC)を培養液に添加し、Trp晶析発酵を実施したところ結晶粒径の増大が認められ、培養後半の菌体量や生産活性の維持といった結晶ストレスの緩和が見いだされた。このように、結晶サイズを制御することで、ストレスが軽減できることを証明した。

本研究により、これまで知られていなかったバクテリアのアミノ酸結晶によるストレス応答を分子レベルで生理的・生化学的に解明するとともに、ストレス緩和に向けた応用開発のための基礎的知見を提示することができた。

Okutani, S., Iwai, T., Iwatani, S., Kondo, K., Osumi, T., Tsujimoto, N., Matsuno, K. (2012) Mechanical damage to *Escherichia coli* cells in a model of amino-acid crystal fermentation, J. Biosci. Bioeng., 113, 487-490.
Okutani, S., Iwai, T., Iwatani, S., Matsuno, K., Takahashi, Y., Hase, T. (2015) Response of Fe-S cluster assembly machinery of *Escherichia coli* to mechanical stress in a model of amino-acid crystal fermentation, J. Biosci. Bioeng., in press.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（奥谷聡志）	
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主査　教　授	長谷　俊治
	副査　教　授	倉光　成紀
	副査　教　授	米崎　哲朗

論文審査の結果の要旨

奥谷聡志君は、アミノ酸の晶析発酵の過程で観察される大腸菌のストレス応答に興味を持ち、その生理学的、生化学的研究に取り組んだ。この研究を進めるあたり、まず、アミノ酸結晶と物性が類似したポリビニルクロライド（PVC）粒子を用いた晶析発酵のモデル実験系を構築した。そして、培養中に添加した PVC 粒子との接触による機械的ストレス下で、大腸菌の代謝やエネルギー産生の変化、及びその際の遺伝子発現のトランスクリプトームを解析してストレス応答の生理的特徴を明らかにした。その結果、解糖系とアミノ酸産生にも関与する TCA 回路を構成する酵素群及びその中の Fe-S クラスター含有酵素のクラスター合成に関わる蛋白質群がストレス応答を示すことを発見した。さらに、このクラスター合成系の成分である分子シャペロンの一種の HscA は、N 末端がトリミングされた新たな分子種として、ストレス細胞内に蓄積することを見出した。HscA を過剰発現させるとストレス条件下で Fe-S クラスター含有酵素の活性が増強できることも示した。また、実際の晶析発酵過程で結晶の粒子サイズを調節して、大腸菌のストレスを軽減する方法を開発し、発酵プロセスの改良の具体的提案も行った。

この成果は、これまで知られていなかったアミノ酸結晶による機械的ストレスに対する大腸菌応答の実態を分子レベルで具体的に明らかにしたものである。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。