

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18380059

研究課題名 (和文) 酢酸菌にみられる特異な「酢酸耐性」機構の分子基盤解析

研究課題名 (英文) Molecular level study for acetic acid resistance mechanism of acetic acid bacteria

研究代表者

松下 一信 (MATSUSHITA KAZUNOBU)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：50107736

研究成果の概要：

酢酸菌の「酢酸発酵」には、酢酸を生成するエタノール酸化能に加えて、生成された高濃度酢酸に対する耐性能が必要である。本研究では、この酢酸耐性機構を、酸化呼吸鎖や酢酸排出系と関連させて、解析した。結果、酢酸菌の属間および種間で様々に異なる能力を示す酢酸耐性能は、共通して、そのエタノール酸化反応、特にその中心となるアルコール脱水素酵素、によるエネルギー生成能と密接に関係していること、細胞膜に存在する酢酸排出系に加えて、細胞膜リン脂質および細胞表面に存在するヘテロ多糖が重要な役割を果たすことが明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2007年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：酢酸菌, 酢酸耐性能, 好気呼吸鎖, エネルギー生成能, 菌膜多糖

## 1. 研究開始当初の背景

酢酸菌による酢酸発酵には、「酢酸生成」反応、「酢酸耐性」反応、および「酢酸過酸化」反応の3つの重要な反応機構が関与している。私たちは、この「酢酸生成」および「酢酸過酸化」反応について、これまで多くの生化学的研究成果を発表してきた。しかしながら、「酢酸耐性」反応についてはエネルギー代謝と関連する高度に複雑な機構であると

予想されるため、さらに細胞膜や細胞壁などの細胞構造と密接に関係していると予想されるため、これまでほとんど手がつけられていなかった。最近になって、「酢酸耐性」に関与する特異な酢酸排出系の存在がしめされてきており、また静置培養で生成される菌膜がこの耐性能に関係しているとする予備的な結果も得られてきて、酢酸発酵におけるこの重要な課題に挑戦できる条件が整ってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、酢酸菌の酢酸発酵に重要な「酢酸耐性」機構を明らかにすることを目的として、関連する以下の項目について解析を試み、その解析を通じてその機構の解明に迫ることとした。

- 1) 酢酸菌の属および種間の酢酸耐性能の違いと適応的酢酸耐性株の解析
- 2) 酢酸菌のエタノール酸化（酢酸生成）反応によるエネルギー生成が酢酸耐性能に及ぼす影響
- 3) 酢酸耐性を保障する「酢酸排出系」および「酢酸防御系」の解析

## 3. 研究の方法

- 1) 使用酢酸菌株：中度酢酸生成菌 *Acetobacter pasteurianus* IFO3283, 耐熱性中度酢酸生成菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU 1108, 高度酢酸生成菌 *Gluconacetobacter europaeus* など
- 2) 培養方法：YPG（酵母エキス・ペプトン・グリセロール）もしくは YPGD（YPG+グルコース）に種々の濃度のエタノールおよび酢酸を含む培地で静置および振盪培養，さらにジャーフェーマンターでの培養を行った。
- 3) 酵素活性の測定：菌体をフレンチプレスで破碎し，超遠心によって細胞膜を集め，常法に従って，アルコール脱水素酵素（ADH）などの種々の酵素活性を測定した。
- 4) 酢酸の取り込み：生菌体および膜小胞を用いて，常法に従って， $^{14}\text{C}$ -Acetate の取り込み活性の測定を行った。

## 4. 研究成果

■ 酢酸菌の属間および種間の酢酸耐性能の違いと適応的酢酸耐性株の解析：酢酸発酵を行う酢酸菌は，高度酢酸生成菌の *G. europaeus* を始めとする *Gluconacetobacter* 属酢酸菌と中度酢酸生成菌 *A. pasteurianus* を始めとする *Acetobacter* 属酢酸菌に大別される。前者は 6~10%酢酸の生成を行うことができ，後者は 2~5%酢酸の生成に使われる。

これら酢酸菌両者の酢酸耐性能の違いの要因の1つとして、細胞膜の ADH 活性に 2 倍以上の違い (*Acetobacter* 酵素の~8U/mg に対し、*Gluconacetobacter* 酵素の~18U/mg) があることがわかった。両者からの精製酵素は同じ比活性(180~190U/mg)をもつことから、ADH の高発現が酢酸耐性の主要因であると考えられた。加えて、*Gluconacetobacter* 酵素

は *Acetobacter* 酵素に比べ、高濃度酢酸に対する耐性を有していることも明らかとなった。

一方で、同じ中度酢酸生成菌 *Acetobacter* 属の中でも、その種によって、またその生育温度によって、様々に異なる酢酸耐性を示すことがわかった。耐熱性酢酸菌 *A. pasteurianus* SKU1108 および MSU10 株は、39°C の高温でも 1.5%酢酸存在下で生育できるが、これらの菌の ADH は常温菌 *A. pasteurianus* IFO3191 の酵素に比べ、その耐熱性だけでなく酢酸に対して高い安定性を示すことが明らかとなった (図 1)。

また、酢酸感受性の *Acetobacter syzygii* SKU19 株から 1%酢酸存在下での培養をくり返すことで酢酸耐性を示す適応株を取得したところ、やはり ADH 活性の増加がみられた。

このように、本研究の結果、「酢酸耐性能」の少なくとも 1 つの要因として酢酸に耐性をもつ ADH の高発現が関係していることが明らかになった。

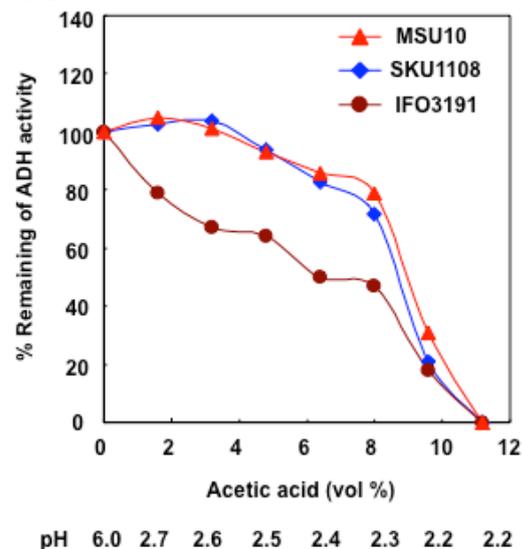


図 1. 耐熱性酢酸菌 (MSU10 および SKU1108 株) の ADH と常温性酢酸菌 (IFO3191 株) の ADH の酢酸に対する耐性の違い これらの菌株から精製された ADH を種々の濃度の酢酸 (下に示すのはそのときの溶液の pH) と氷中で 30 分間インキュベートした後の活性を測定した。

■ エタノール酸化系エネルギー生成反応と酢酸耐性能の関係：酢酸菌は酢酸発酵時に「酢酸耐性能」を示す。上述したように、エタノール酸化系の初発に関与する ADH が酢酸耐性と密接にリンクしていることから、これには酢酸生成反応を行うエタノール酸化系呼吸鎖によるエネルギー生成が寄与している可能性が高い。そこで、エタノール以外

の酸化系でも酢酸耐性のためのエネルギー供給を行えるか否かを明らかにするため、乳酸やコハク酸などの呼吸基質をエタノールに代えて与え、その「酢酸耐性能」に及ぼす影響を比較解析した。その結果、これらの基質でもある程度の酢酸耐性が認められたことから、ADH 自身と言うよりは、ADH を初発とするエタノール酸化系呼吸鎖のエネルギー生成能が酢酸耐性の要因となっていると考えられた。

酢酸菌の酢酸発酵は、エタノール酸化期、酢酸耐性期、酢酸過酸化期の各生育期によって、エネルギー生成能および酢酸耐性能は変化する。そこで、*A. pasteurianus* IFO3283 株の各生育期における呼吸鎖とエネルギー生成能について検討した。まず、呼吸鎖末端オキシダーゼを低温スペクトルで解析し、エタノール酸化期に Cytochrome *ba*<sub>3</sub> ユビキノール・オキシダーゼが高濃度生成し、耐性期および過酸化期ではそれが著しく低下して別のシアン耐性オキシダーゼ、ユビキノール *bd* もしくはシアン非感受性オキシダーゼ CIO に変化することがわかった。一方、初発で働く NADH 脱水素酵素には Type I と Type II の 2 つが機能していることが明らかとなったが、エタノール酸化期にどちらが主に機能しているかはまだ明らかになっていない。また、膜小胞による種々の基質によるエネルギー生成能を検討した結果、エタノールに加えて、グルコース、乳酸、および NADH によってもエネルギー生成が起ることが示された。

このようにして、まだその詳細は明らかではないが酢酸耐性を示すエタノール酸化期の細胞では Cytochrome *ba*<sub>3</sub> オキシダーゼを末端に持つ呼吸鎖で主にエタノールの酸化によってエネルギー生産を行っていることが示唆された。

■ 酢酸耐性を保障する「酢酸排出系」および「酢酸防御系」についての解析：「酢酸耐性期」の急速な生菌数の減少する時期に、CSLM を用いた生菌・死菌の解析を行った結果、多くの死菌に加えて、生死中立のように見える細胞が観察された。しかも、これらの細胞の多くは何らかの膜様のものに覆われているように観察された。これらの酢酸発酵時の菌を寒天プレート上で観察すると、発酵にともなって、S (滑面のコロニーを示す) が減少し、逆に R 株 (粗面コロニーを示す) が増加することが示された。R 株は菌膜多糖を生成することが知られているので、菌膜多糖を生成できない S 株と R 株での生菌体による <sup>14</sup>C-Acetate の取り込み (流入) 活性を測定

した。その結果、欠損株での取り込み (流入) 活性が高いことが示され、菌膜多糖が酢酸耐性と相関があることが示唆された (図 2)。

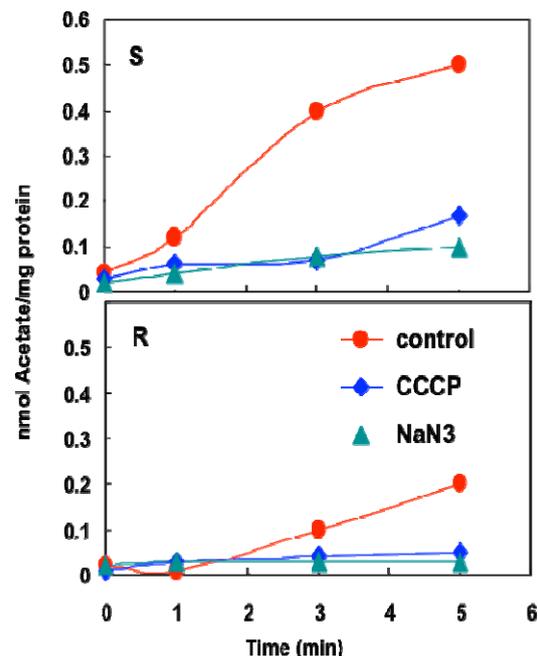


図 2. *A. pasteurianus* MSU10 の R 株と S 株の酢酸の取り込みの違い 各菌体懸濁液 (pH6.5) に 0.4 mM [1-<sup>14</sup>C] acetate を添加して、その取り込み活性を測定した。

一方、高度酢酸生成菌 *Gluconacetobacter* において、その培養基に含まれる酢酸の濃度を高めてゆくと、細胞膜のリン脂質組成と脂肪酸組成に変化が現れることが明らかとなった。つまり、ホスファチジルエタノールアミンとカルジオリピンが減少し、ホスファチジルコリンとホスファチジルグルセロールが増加した。加えて、それらのリン脂質の主要脂肪酸である不飽和 *cis*-パクセ酸が増加した。このように、細胞膜のリン脂質の組成と構造も酢酸耐性に重要な影響を与えることが明らかとなった。

酢酸排出系の解析は、これまで中度酢酸生成菌 *A. pasteurianus* で解析が進められている。しかし、酢酸発酵下の菌体による酢酸排出能を詳細に解析するためには、膜小胞や反転膜小胞を使った解析をすすめる必要がある。そのため、YPG 培地で培養した細胞の休止菌体、さらにそこから調製された膜小胞を用いた <sup>14</sup>C-Acetate の取り込み活性の測定を行った。これら生菌体および膜小胞では、その取り込み活性が認められたが、排出活性を明確に示す結果は得られなかった。そこで、酢酸耐性において重要な役割を担うと思われる酢酸排出系を解析するために、酢酸発酵条件下の

菌体からの膜小胞の調製と同時に、非発酵時菌体および発酵条件下からの反転膜小胞の調製法の開発が進められてきた。現在、それらの方法が一部確立され、またその他についても確立できる展望がでてきた。今後、これらの膜小胞および反転小胞の調製法を早急に確立し、それらを用いた酢酸の取り込みを解析することによって、酢酸排出機構を解明したい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① T. Mogi, Y. Ano, T. Nakatsuka, H. Toyama, A. Mouri, H. Miyoshi, C. T. Migita, H. Ui, K. Shiomi, S. Omura, K. Kita, K. Matsushita. Biochemical and spectroscopic properties of cyanide-insensitive quinol oxidase from *Gluconobacter oxydans*. *J. Biochem.* in press. 査読有り
- ② K. Matsushita, Y. Kobayashi, M. Mizuguchi, H. Toyama, O. Adachi, K. Sakamoto, H. Miyoshi. A tightly bound quinone functions in ubiquinone reaction sites of quinoprotein alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria, *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72 (10), 2723-2731 (2008) 査読有り
- ③ 松下一信, 赤田倫治, 山田 守: 耐熱性発酵微生物の発見とその展開; 化学と生物 46 (7) 472-477 (2008) 査読なし
- ④ W. Sintuprapa, G. Theeragool, W. Yongmanitchai, P. Srifah-Huehne, K. Matsushita. Molecular taxonomy of *Acetobacter syzygii* SKU19 and Characterization of its acetic acid adapted strains. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 42: 701-714 (2008) 査読有り
- ⑤ 松下一信: タイで分離された耐熱性酢酸菌の機能解析とその利用; バイオサイエンスとインダストリー 66 (3) 130-134 (2008) 査読なし
- ⑥ Y. Ano, H. Toyama, O. Adachi, K. Matsushita. Energy metabolism of unique acetic acid bacterium, *Asaia bogorensis*, which lacks ethanol oxidation activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72 (4), 989-997 (2008) 査読有り
- ⑦ 松下一信: 新規な微生物資源としての耐熱性酢酸菌の分離・分類・保存および機能解析; Institute For Fermentation, Osaka, Research Communications 21, 19-29 (2007) 査読有り
- ⑧ Trcek J, Jernejc K, Matsushita K.; The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. *Extremophiles* 11(4): 627- 635

(2007) 査読有り

- ⑨ A. Deeraksa, S. Moonmangmee, H. Toyama, O. Adachi and K. Matsushita: Conversion of capsular polysaccharide, involved in pellicle formation, to extracellular polysaccharide by *galE* deletion in *Acetobacter tropicalis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2536-2539 (2006) 査読有り
- ⑩ J. Trcek, H. Toyama, J. Czuba, A. Misiewicz, and K. Matsushita: Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70 (3):366-373 (2006) 査読有り

[学会発表] (計 13 件)

- ① W. Soemphol, A. Deeraksa, H. Toyama, O. Adachi, K. Matsushita; Characterization in some thermosensitive mutants obtained from thermotolerant *Acetobacter tropicalis* SKU1100; 日本農芸化学会 2009 年度大会 (平成 21 年 3 月 29 日; 福岡) 講演要旨集 p.239
- ② 秦野智行、今田智子、外山博英, 薬師寿治, 足立収生、松下一信: 高温適応酢酸発酵株の育種とその機能解析; 日本農芸化学会 2009 年度大会 (平成 21 年 3 月 28 日; 福岡) 講演要旨集 p.106
- ③ W. Kanchanarach, O. Adachi, H. Toyama, K. Matsushita: Purification and characterization of alcohol dehydrogenases from thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains; 2<sup>nd</sup> International Conference on Acetic Acid Bacteria (2<sup>nd</sup> ICAAB) held in Nogoya, Japan, from 11<sup>st</sup> November to 14th November, 2008.
- ④ Y. Matsumura, T. Yakushi, O. Adachi, K. Matsushita: Respiratory chain related to acetic acid fermentation in *Acetobacter pasteurianus* IFO 3283; 2<sup>nd</sup> International Conference on Acetic Acid Bacteria (2<sup>nd</sup> ICAAB) held in Nogoya, Japan, from 11<sup>st</sup> November to 14th November, 2008.
- ⑤ T. Hatano, T. Imada, O. Adachi, H. Toyama, K. Matsushita: High Temperature-Acetic Acid Fermentation in Thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* SKU 1108; 2<sup>nd</sup> International Conference on Acetic Acid Bacteria (2<sup>nd</sup> ICAAB) held in Nogoya, Japan, from 11<sup>st</sup> November to 14th November, 2008.
- ⑥ M. Goto, I. Miyahara, K. Hirotsu, Y. Kobayashi, T. Nakatsuka, H. Toyama, O. Adachi, K. Matsushita: Analysis of structure and function of membrane-bound alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria; 2<sup>nd</sup> International Conference on Acetic Acid Bacteria (2<sup>nd</sup> ICAAB) held in Nogoya, Japan, from 11<sup>st</sup> November to 14th November, 2008.

⑦ G. Theeragool, U. Masud, W. Sintuprapa, H. Toyama, O. Adachi, K. Matsushita: Expression of Quinoprotein Alcohol Dehydrogenase (PQQ-ADH) and Adaptive Responses to High Concentration of Ethanol and Acetic Acid in Thermotolerant Acetic Acid Bacteria; 2<sup>nd</sup> International Conference on Acetic Acid Bacteria (2<sup>nd</sup> ICAAB) held in Nogoya, Japan, from 11<sup>st</sup> November to 14th November, 2008.

⑧ W. Soemphol, A. Deeraksa, H. Toyama, O. Adachi, K. Matsushita: Isolation and characterization of genes involved in thermotolerance in thermotolerant *Acetobacter*. 日本農芸化学会 2008 年度大会 (平成 20 年 3 月 28 日; 福岡) 講演要旨集 p.241

⑨ 後藤勝, 宮原郁子, 広津建, 小林由宜, 中柄朋子, 外山博英, 足立収生, 松下一信: 酢酸菌アルコール脱水素酵素の立体構造; 日本生体エネルギー研究会第 33 回討論会 (2007 年 11 月 16 日; 山口大学) 講演要旨集 p.41~42

⑩ G. Theeragool, P. Chinnawirotpisan, W. Sintuprapa, U. Masud, N. Lotong, W. Kanchanarach, H. Toyama, O. Adachi, K. Matsushita: Molecular characterization of quinoprotein alcohol dehydrogenase (PQQ-ADH) and NAD-dependent alcohol dehydrogenases (NAD-ADHs) in thermotolerant acetic acid bacteria; The 6<sup>th</sup> JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications, Walailak, Thailand, Oct 18-20 (2007)

⑪ S. Moonmangmee, A. Deeraksa, S. Tantratian, H. Toyama, O. Adachi, G. Theeragool, N. Lotong, K. Matsushita: Production mechanism of pellicle poly-saccharide in thermotolerant acetic acid bacteria; The 6<sup>th</sup> JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications, Walailak, Thailand, Oct 18-20 (2007)

⑫ 加山知穂、小池雅文、滝川雄介、福島浩太、阿野嘉孝、外山博英、松下一信: *Acetobacter* 属酢酸菌の *ctaA* のクローニングとその機能解析; 日本生体エネルギー研究会第 32 回討論会 (2006 年 12 月 14 日; 東工大) 講演要旨集 p-21⑬ 中柄朋子、小林由宜、外山博英、足立収生、松下一信: 酢酸菌アルコール脱水素酵素の結合型キノンの機能; 日本生体エネルギー研究会第 32 回討論会 (2006 年 12 月 14 日; 東工大) 講演要旨集 p-20

[図書] (計 3 件)

① 松下一信他 203 名共同執筆: 酵素ハンドブック第 3 版 (編集: 八木達彦, 福井俊郎, 一島英治, 鏡山博行, 虎谷哲夫) 朝倉書店 (2008 年 5 月 30 日)

② 松下一信: バイオフィルムの基礎と制御 (株) エヌ・ティイー・エス 第 1 編 基礎編:

第 1 章 特性: 第 3 節 細胞外多糖: 酢酸菌が生成する菌膜ヘテロ多糖, pp.54-64. (2008 年 2 月 4 日)

③ J. Trcek, H. Toyama, J. Czuba, A. Misiewicz, and K. Matsushita: Towards understanding the acetic acid resistance in *Gluconacetobacter europaeus*. In: Modern Multidisciplinary Applied Microbiology, A. Mendez-Vilas (ed), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, pp.674-678 (2006)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

① 名称: 高温酢酸発酵酢酸菌

発明者: 松下一信、秦野智行、薬師寿治、足立収生

権利者: 山口大学

種類・番号: 特願 2008-287703

出願年月日: 20 年 11 月 10 日

国内特許

② 名称: 酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* IFO3191 が産生するヘテロ多糖からなるメラニン生産抑制剤

発明者: 大岡 朗、松下一信、外山博英、アーバポーン・デラクサ、ソンポーン・ムーマンミー、足立収生

権利者: 宇部興産/山口大学

種類・番号: 特願 2007-96621

取得年月日: 平成 19 年 4 月 21 日

国内特許

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究室ホームページ: <http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~oubi>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下一信 (Matsushita Kazunobu)

山口大学・農学部・教授

研究者番号: 50107736

(2) 研究分担者 (2006 年度)

外山 博英 (Toyama Hirohide)

山口大学・大学院医学系研究科・助教授

研究者番号: 60240884

(3) 連携研究者

なし