

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780051

研究課題名(和文) 酢酸菌の運動性と発酵生産に関する研究

研究課題名(英文) Studies on relationships between flagellar motility and oxidative fermentation by acetic acid bacteria

研究代表者

薬師 寿治 (YAKUSHI TOSHIHARU)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30324388

研究成果の概要(和文)：

酢酸菌の酸化発酵は、酸化反応産物をほぼ定量的に培地中に蓄積するユニークな代謝系であるが、その反応は呼吸鎖に組み込まれており、物質の酸化に共役してエネルギー(プロトン駆動力)を産生する。バクテリアのべん毛モーターは、プロトン駆動力を回転エネルギーに変換する運動器官である。このエネルギー生産系とエネルギー消費系を解析することによって、エネルギー代謝と酸化発酵の関連について理解を深めることが、本研究の目的である。本研究では以下の3つを成果としてあげることができる。(1) 酢酸菌のべん毛運動に関わる遺伝子を逆遺伝学的に見いだした。(2) 酢酸菌のべん毛運動が、栄養豊富培地での培養後期に、あるいは酢酸によって誘導されることがわかった。(3) 上述のべん毛関連遺伝子の欠損、相補、過剰発現などの菌株を用い酢酸発酵試験を行った。欠損株は生育が若干良かったにもかかわらず、酸生成にはほとんど影響がなかった。すなわち、べん毛モーターによるエネルギー消費がない株では、その分生育が良くなる一方で細胞当たりの酸化発酵能は低下すると考察した。つまり、運動性と細胞当たりの発酵生産は正の相関があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

Oxidative fermentation by acetic acid bacteria, where substrates are oxidized by the respiratory chain-linked dehydrogenases, accumulates oxidation products to the culture medium, such as acetic acid from ethanol. Such incomplete oxidation produces proton motive force across the membrane for energy to drive ATP synthesis and others. Flagella are locomotive organelles of bacteria, which require proton motive force at work. This study hypothesizes that energy metabolism is crucial in the oxidative fermentation. Thus, the flagellar motility of acetic acid bacteria was modulated to see effects on the oxidative fermentation. This study found that (i) the *motB1* gene is involved in the flagellar motility through reverse genetic approach. (ii) The flagellar motility of acetic acid bacteria is induced by acetic acid as well as under nutrient rich conditions in the late growth phase. (iii) Acetic acid fermentation study using immotile mutant and over producing mutant strains revealed that the immotile mutant grew better than wild type but produced acid at almost same levels of wild type. The data suggest that acid productivity per cell of the immotile mutant is worse than that of wild type, and thus positive correlation between motility and oxidative fermentation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物機能，発酵生産，べん毛モーター，生体エネルギー変換，運動，酢酸菌酸化発酵，エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

食酢の発酵生産を行う酢酸菌は、ビタミンC合成の中間体生産などのさまざまな糖質の酸化発酵にも用いられている。この酸化発酵は不完全酸化とも呼ばれ、酸化反応産物をほぼ定量的に蓄積するきわめてユニークな代謝を営む。酢酸菌の酸化反応はその呼吸鎖電子伝達系に組み込まれた一連の酵素群によるものである。すなわち、物質の酸化が本菌の生体エネルギー（プロトン駆動力）生産に直結している。細菌の運動能は、その細菌にとって「より好ましい」方向に移動するという走性に代表されるように、生存戦略といった進化上重要な機能を果たしてきたと考えられる。一般に細菌の走性を支える運動器官であるべん毛モーターは、プロトン駆動力というエネルギーを回転エネルギーに変換する。1回転あたり500個のイオンが使われ、毎秒300回転で回転するとする報告に従えば、相当のイオン駆動力が失われることになる。その背景で考えると、運動に関わる装置や仕組みが細菌の物質代謝・エネルギー代謝に何らかの影響を及ぼすことが考えられる。

2. 研究の目的

古典的な代謝工学的アプローチとして、微生物による発酵の生産性の向上を目的に、関与する酵素自身のコントロールが従来行われてきた。しかし本課題では、単に物質変換を担う酵素を操作する古典的な代謝工学から脱却し、エネルギー代謝を例として、細胞生理を見通した代謝工学を試みた。具体的には、酸化発酵によって生み出される過剰なエネルギーが発酵生産の制約要因であると考え、生体エネルギーの浪費を誘導する目的として、遺伝子工学的にべん毛モーターの制御を行った。

本研究の前半では、酢酸菌の運動性とべん毛モーターの基礎的な性質を解き明かし、後半ではべん毛モーターと発酵生産との関連

について解析を行った。この解析を通して、生体エネルギーと発酵生産の関連についての理解を深め、代謝工学の発展に貢献することを目指した。

3. 研究の方法

本研究課題では、次に挙げる1から4の項目に関する研究を計画した。全体を通して、逆遺伝学的手法と生化学的手法を組み合わせ、酢酸菌の運動と酸化発酵生産の関連について解析した。

(1) 酢酸菌のべん毛モーターの分子生物学的解析。べん毛運動の安定性、共役イオン、イオンチャンネル（力発生ユニット）の解析などを中心に、べん毛モーターの基本的性質を明らかにする。

(2) 安定して酢酸菌が遊泳する条件の検討。

(3) べん毛モーターの機能制御と発酵生産の関連。

前半は主に運動性に関する解析を、後半は運動と発酵との関連の解析を中心に行った。

4. 研究成果

(1) 酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* の2つのべん毛モーター遺伝子

ゲノムが解読された酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* 621H株には、べん毛モーターのプロトン流を担うサブユニットをコードする *motB* 遺伝子が2つ (*GOX127* と *GOX240*) が存在する。本研究では、*GOX127* と *GOX240* をそれぞれ *motB1* と *motB2* と名付け、逆遺伝学解析を行った。621H株の遺伝子破壊法を新たに開発し、この方法を用いてそれぞれの遺伝子の破壊株を作製した(図1)。また、広宿主域ベクターを用いて相補プラスミドを作製した。 $\Delta$ *motB1*株は遊泳能を失ったが、 $\Delta$ *motB2*株は野生株並みに遊泳した。 $\Delta$ *motB1*株は、*motB1-motA1*を*adh*プロモーターでドライブする相補プラスミドの導入により遊泳能を回復した(図2)。以上のように、本菌株で

遺伝子破壊とその相補実験を行い、逆遺伝学解析の基礎を確立した。

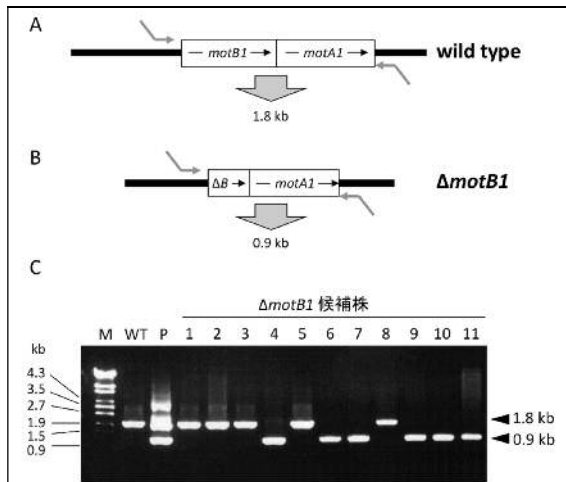


図 1. *motB1* 遺伝子破壊株の作製

野生型 (A) と欠失型 (B) ではそれぞれ 1.8 kb と 0.9 kb の PCR 産物を生じる。11 の候補菌株から抽出した染色体 DNA を親鎖として PCR を行った。M はサイズマーカー、WT は親株、P は 1 回組み換え体。候補株 4, 6, 7, 9, 10, 11 が欠失体であることが判明した。

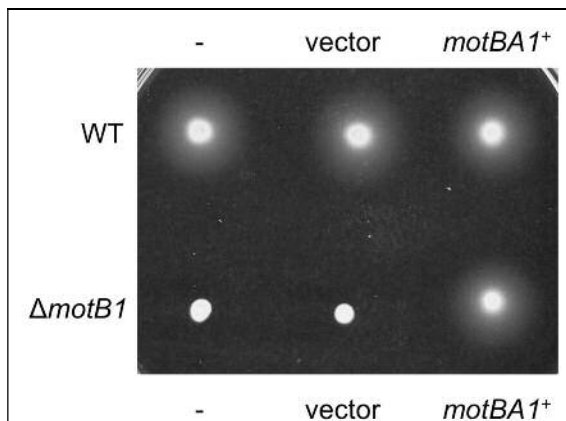


図 2. *motB1* 遺伝子の破壊による運動能の喪失と遺伝子相補による回復

*Gluconobacter* 野生株 (上段) と *motB1* 破壊株 (下段) に *motBA1* を持つプラスミド、あるいはその対照プラスミドを導入した菌株を 0.3% 軟寒天培地に植菌し、2 日間培養した。運動能を有する菌株は植菌位置から広がることができる。

(2) 酢酸菌 *Gluconobacter* のべん毛運動の誘導条件

顕微鏡観察を行ったところ、気液界面で良好に遊泳したため、べん毛運動に酸素が必要であることが示唆された。本菌のべん毛運動は、グルコースやエタノールなど、本菌が酸化することのできる物質の存在下に誘導された。あまりべん毛運動を誘導しないグリセロールなどの物質でも、高濃度の培養条件ではべん毛運動を誘導した。培養の初期ではほ

とんど運動しないが、培養後期で運動を誘導した。

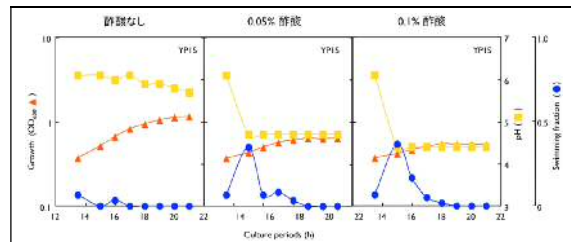


図 3. 酢酸によるべん毛運動の誘導

*Gluconobacter* を対数増殖期まで生育させ 0.05% (中央)、あるいは 0.1% (右) となるように酢酸を加え培養を続けた。左は酢酸を加えない対照実験。酢酸を加えるとべん毛運動 (丸印) が誘導された。

エタノールの添加によって良好にべん毛運動を誘導するが、本菌はエタノールを速やかに酢酸に変換する。そこで、酢酸を培養液に加えてみたところ、酢酸でも遊泳を誘導した (図 3)。酢酸自身によるものか、膜透過性弱酸としての影響なのか、今後の解析が必要であるが、本菌が酢酸に対する耐性能を持っていることから、興味深い結果である。

(3) べん毛モーターの機能制御と発酵生産の関連

べん毛モーターをエネルギー消費系としてとらえ、べん毛モーター機能を制御することによる酸化発酵への影響を調べた。上記 (1) で作製した酢酸菌 *G. oxydans* 621H 株の、べん毛モーターのプロトン流を担うサブユニットをコードする *motB1* 遺伝子の欠失株 ( $\Delta$ *motB1* 株)、その菌株に機能不全を相補するプラスミドを導入した相補株、ならびに関連する菌株を用いて、運動能、酢酸発酵能を調べた (図 4)。相補株は野生株よりも長時間運動能を維持していたので、野生株よりも運動能が強化されたと考えた。若干ながらも相補株、野生株、 $\Delta$ *motB1* 株の順で生育が悪かった。しかし、酢酸発酵の指標の一つである pH 低下については菌株間での差異は見いだせなかった。野生株に比べて相補株が、生育が悪くても酢酸発酵能に変化がなかったこ

菌株	運動能	生育	酸生成能
$\Delta$ <i>motB1</i> / vector	No	Better	Less
$\Delta$ <i>motB1</i> / <i>motBA1</i> <sup>+</sup>	↑	↑	↑
WT / vector	Better	Less	Better
WT / <i>motBA1</i> <sup>+</sup>	↓	↓	↓

図 4. べん毛運動の制御による酸化発酵への影響

べん毛運動を人為的に制御して作製した *Gluconobacter* 菌株を用いて運動能、生育、酸生成を解析し、その結果をまとめた。運動能と生育には負の相関が、運動能と細胞当たりの酸生成には正の相関が見られた。

とから、べん毛運動の強化が細胞あたりの酢酸発酵能を上昇させることを示唆すると考察した。相補株では野生株よりもべん毛モーターの機能を高く維持でき、その分エネルギーを消費するため生育が悪くなる一方で、エネルギー負荷がなくなるため、発酵生産能を向上させたのではないだろうか。膜電位の形成や膜のプロトン伝導度の比較を行い、各菌株におけるプロトン駆動力形成能を明らかにすることで、この仮説を検証できると考えている。

#### 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6件)

- ① Adachi O, Hours RA, Akakabe Y, Tanasupawat S, Yukphan P, Shinagawa E, Yakushi T, Matsushita K. (2010) Production of 4-keto-D-arabonate by oxidative fermentation with newly isolated *Gluconacetobacter liquefaciens*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 査読有 74: 2555-2558.
- ② Yakushi T, Matsushita K. (2010) Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 査読有 86: 1257-1265.
- ③ Kanchanarach W, Theeragool G, Yakushi T, Toyama H, Adachi O, Matsushita K. (2010) Characterization of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains and their quinoprotein alcohol dehydrogenases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 査読有 85: 741-751.
- ④ Habe H, Shimada Y, Yakushi T, Hattori H, Ano Y, Fukuoka T, Kitamoto D, Itagaki M, Watanabe K, Yanagishita H, Matsushita K, Sakaki K. (2009) Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol. *Appl Environ Microbiol*. 査読有 75: 7760-7766.
- ⑤ Hizukuri Y, Morton JF, Yakushi T, Kojima S, Homma M. (2009) The peptidoglycan-binding (PGB) domain of the *Escherichia coli* pal protein can also function as the PGB domain in *E. coli* flagellar motor protein MotB. *J Biochem*. 査読有 146: 219-229.
- ⑥ Obara M, Yakushi T, Kojima S, Homma M. (2008) Roles of charged residues in the C-terminal region of PomA, a stator component of the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor. *J Bacteriol*. 査読有 190: 3565-3571.

[学会発表] (計11件)

- ① 藤井雅子, 窪田真也, 薬師寿治, 保坂 毅, 千 菊夫, 松下一信: 酢酸菌 *Gluconobacter* のべん毛運動の制御による酸化発酵への影響, 日本農芸化学会 2011 年度大会 (2011 年 3 月 27 日, 京都女子大学, 京都) 講演要旨集 p. 245
- ② Yakushi T, Fujii M, Kubota S, Hosaka T, Sen K, Matsushita K. Conditions acetic acid bacteria induce the flagellum-based motility. The 3<sup>rd</sup> Asian Core Program Satellite Seminar (20th. Nov. 2010, Thailand) p. 61
- ③ 薬師寿治, 窪田真也, 藤井雅子, 保坂 毅, 千 菊夫, 松下一信: *Gluconobacter* 属酢酸菌のべん毛運動の誘導, 日本農芸化学会中四国支部 2010 年度支部大会 (2010 年 9 月 25 日, 香川大学, 香川) 講演要旨集 p. 73
- ④ Yakushi T, Kubota S, Fujii M, Hosaka T, Sen K, Matsushita K. Induction of the flagellar motility in *Gluconobacter oxydans*, an acetic acid bacterium. 日本生物物理学会第 48 回年会 (2010 年 9 月 21 日, 東北大学, 宮城) 講演要旨集 p. S55
- ⑤ 薬師寿治, 藤井雅子, 窪田真也, 保坂 毅, 千 菊夫, 松下一信: 酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* 621H 株における 2 つのべん毛モーター遺伝子 *motB* ホモログの解析, 日本農芸化学会 2010 年度大会 (2010 年 3 月 30 日, 東京大学, 東京) 講演要旨集 p. 276
- ⑥ Yakushi T, Kubota S, Hosaka T, Sen K, Matsushita K. Flagellar motility of *Gluconobacter* species under acidic conditions. 日本生物物理学会第 47 回年会 (2009 年 11 月 1 日, アスティとくしま, 徳島) 講演要旨集 p. S127
- ⑦ Yakushi T, Kubota S, Hosaka T, Sen K, Matsushita K. Flagellum-based motility of *Gluconobacter oxydans* under acidic conditions. The 3<sup>rd</sup> International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (Aug., 2009, Thailand) p. 61
- ⑧ 窪田真也, 薬師寿治, 保坂 毅, 千 菊夫, 松下一信: 酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* のべん毛に依存した運動, 日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3 月 28 日, マリンメッセ福岡, 福岡) 講演要旨集 p. 106
- ⑨ Kubota S, Yakushi T, Hosaka T, Sen K, Matsushita K. Motility of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans* 621H. 日本生物物理学会第 46 回年会 (2008 年 12 月 4 日, 福岡国際会議場, 福岡) 講演要旨集 p. S107
- ⑩ Kubota S, Yakushi T, Hosaka T, Sen K, Matsushita K. Flagellum-based motility of *Gluconobacter oxydans*. 2<sup>nd</sup> International Conference on Acetic Acid Bacteria (Nov.,

2008, Nagoya University, Aichi) p. 102  
⑩ 薬師寿治, 窪田真也, 保坂 毅, 千 菊夫,  
松下一信: 酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* の  
走性, 日本農芸化学会中四国支部 2008 年度  
支部大会 (2008 年 9 月, 鳥取大学, 鳥取) 講  
演要旨集 p. 61

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 外来 DNA を挿入しない酢酸菌の遺伝子  
欠損法

発明者: 薬師寿治, 藤井雅子, 松下一信

権利者: 山口大学

種類・番号: 特願 2010-277477

出願年月日: 平成 22 年 12 月 13 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~oubi/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

薬師 寿治 (YAKUSHI TOSHIHARU)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 30324388