

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830126

研究課題名(和文) 酢酸菌・近縁種内の比較ゲノム・フェノーム解析に基づく種内の機能比較

研究課題名(英文) Comparative genomics and phenome analysis of closely related Acetic acid bacteria

研究代表者

松谷 峰之介 (Matsutani, Minenosuke)

山口大学・創成科学研究科・学術研究員

研究者番号：70380558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：酢酸菌は工業的に食酢の醸造に用いられている。多くの近縁種または株が報告されているが、これらの株は互いに近縁であるにも関わらず、しばしばかなり異なる表現型を示すことが知られている。表現型の違いの原因を遺伝的な要因から明らかにするために、酢酸菌近縁株9株についてゲノム配列解析と比較ゲノム解析と表現型比較を行った。その結果、タイで分離された株SKU1108が、最も高い耐熱性を示した。この株と最も近縁であったのは、アフリカ由来の株であったため、これらの株では熱帯環境への適応が起きていることが示唆された。また個々の株の耐熱性が耐熱遺伝子により直接的な影響を受けていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Acetic acid bacteria (AAB) is industrially used for the production of vinegar. Although many closely related strains have been reported, these strains have different phenotypic characteristics. To understand the genetic background underpinning their phenotypes, the genome sequencing of nine closely related AAB strains was performed, and compared with their phenotypes. As a result, strain isolated from Thailand, SKU1108, was most closely related to strain isolated from Africa and showed highest thermotolerant phenotype, suggesting that their strains adapted to tropical niches. It was suggested that their thermotolerant phenotype is directly affected by their thermotolerant genes.

研究分野：微生物ゲノム解析

キーワード：同一種多菌株比較ゲノム 酢酸菌 表現型解析

1. 研究開始当初の背景

酢酸菌は、分子系統学の進展にともなって次々と新属が見つかり、2009年の時点で10属以上に分類されるようになってきている。しかしながら、産業利用の視点で見ると、古くから分類されてきた *Acetobacter* 属、*Gluconacetobacter* 属および *Gluconobacter* 属が酢酸菌の中心的な属を形成していると言える。これらの属は、その生理学的な機能の違いが顕著であり、*Gluconobacter* 属菌はその高い糖酸化能から、ソルボース発酵やジヒドロキシアセトン発酵に利用されている。

一方で、*Acetobacter* 属菌と *Gluconacetobacter* 属菌は、その高い酢酸発酵能力(エタノール酸化能と酢酸耐性能)のために、食酢醸造に利用されている。前者は、古来から樽や瓶の中で培地表面に薄い菌膜をつくらせて行われる静置培養法で行われてきた中酸度発酵(4~5%酢酸)に、後者はタンク(アセテータ)を用いた通気攪拌培養による高酸度発酵(10~15%酢酸)に使われている。しかしながら、この酢酸発酵のエタノール酸化呼吸鎖や過酸化代謝などについて一定の理解が得られてきたが、「酢酸耐性」機構を始め、過酸化の開始制御など多くの機能が解明されていない(図1)。

加えて、酢酸発酵にはいくつかの不安定要因があり、高品質のものを安定に生産することを難しくしている。特に、酢酸生成能の低下、生産された酢酸によって菌が死滅する現象(酢酸耐性の喪失)、さらに生産された酢酸をすぐに消費してしまう現象(強すぎる過酸化)を頻繁に生じる。これらの現象を理解し、解決するためにも、「酢酸発酵」機構に関わる遺伝子群を網羅的に理解する必要があり、これまでの手法を超える新規なアイデアとそれに基づく研究が必要となっている。

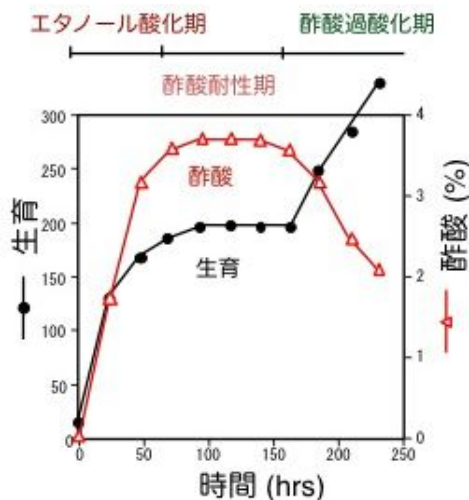


図1 酢酸発酵に見られる *Acetobacter* 属酢酸菌の二段階生育。

2. 研究の目的

同一、または近縁種で互いに極めて近縁ではあるが、由来の異なる複数の酢酸菌株を用いて、そのゲノム情報(ゲノム中のコードされる遺伝子の情報)とそれぞれの株の表現型との相関関係を解明することを最終的な到達点として、酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* 多菌株の表現型比較、概要ゲノム配列の解析とその遺伝子のレパートリ、及び近縁株の表現型の違いに直接影響を及ぼす因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 既に報告済みの3株を加えた12株の「生育温度」「エタノール酸化能」「酢酸耐性能」「酢酸過酸化能」などの表現型の比較(フェノーム解析)。

(2) NBRC 所有の *Acetobacter pasteurianus* 複数株のドラフトゲノムまたは完全長ゲノム配列の解析及び比較ゲノム解析。ゲノム情報を用いた株間の系統関係の推定。

(3) ゲノム情報が特に近縁なグループについて、の詳細な解析。過去の文献情報などから耐熱性、酢酸発酵能などに寄与している遺伝子との相関の検討。

(4) 比較ゲノムとフェノーム解析データから予測された個々の表現型を支配している遺伝子群、変異箇所について、実験的な手法で検証。

4. 研究成果

(1) 酢酸菌12株の表現型(特に耐熱性)の比較(フェノーム解析)

今回、NBRCに登録されており、菌株が取得可能な12株について表現型(特に耐熱性)の比較解析を行った。図2に示すように、ポテト培地(非発酵条件下)において12株の生育限界温度を比較した。その結果、NBRC 161055株(SKU1108)が他の株と比較して、顕著な耐熱性を示すということが明らかとなった。

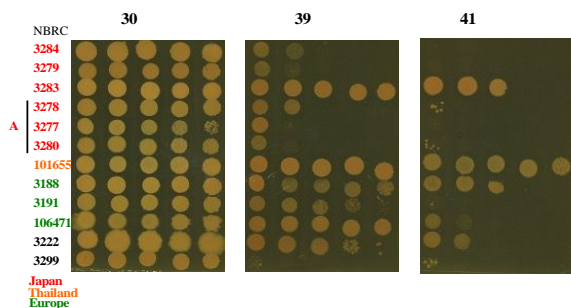


図2 非発酵条件下(ポテト培地)におけるドットスポットによる酢酸菌12株の生育限界温度の比較。

その他には、NBRC 3188, NBRC 3283 株などが比較的高い耐熱性を示した。SKU1108 はタイのフルーツから分離された株であり、アフリカで単離された 386B 株と共に極めて高い耐熱性を示すことが既に Illegheems らによって報告されている。そのため、熱帯地域で単離された株がより高い耐熱性を示すということ、すなわち熱帯環境への適応進化が引き起こされていることが強く示唆された。酢酸発酵条件下においても、同様に生育限界温度の比較を行った。生育限界温度は 2 ほど低下したが、非発酵条件下と同様に SKU1108 が最も高温で生育可能であった。

(2) NBRC 所有の *A. pasteurianus* 複数株の比較ゲノム解析

特に高い耐熱性を示した SKU1108 株について PacBio RSII と Illumina シークエンサを用いて完全長ゲノム配列を決定した¹⁾。また、既に概要または完全長ゲノム配列が報告されている NBRC 3191, NBRC 3283 を除く 9 株について Illumina シークエンサによるゲノム解析を行い、表現型比較に用いた 12 株全てのゲノム情報を得た。

ここに他のグループが報告した近縁株 11 株 (ショウジョウバエ由来の *Acetobacter pomorum* 2 株) を追加して、パンゲノム解析を行ったところ、1,717 のコアゲノムと 5,542 のパンゲノムを有することが明らかとなった。一般的に細胞内寄生細菌などホストに依存している菌では、パンゲノム中でコアゲノムの占める割合が高く、ホストに依存しない菌では、コアゲノムの割合は低いことが知られている。酢酸菌は、フルーツや花などの糖度・栄養度の高い場所に好んで生存することが知られており、環境にかなり依存していると考えられるが、コアゲノムの割合は約 31% と低く、free-living bacteria の特徴を有するということが明らかとなった。

全 21 株のゲノムデータを用いて、遺伝子の機能分類に基づいた Gene content 解析を行ったところ、NBRC 3277, NBRC 3278, NBRC 3280, NBRC 3188 の 4 株が 1 つのクラスタを形成した。このクラスタのみで共通で保存された因子を調べると、鞭毛構成に関連する因子が多く存在しており、このクラスタに属する株のみが鞭毛モーターを有することが明らかとなった。またショウジョウバエ由来の *A. pomorum* 2 株も 1 つのクラスタを作っており、2 株のみで特異的に保持されている遺伝子群のなかには、既に他のショウジョウバエ由来・非由来株の酢酸菌の比較ゲノムから昆虫共生との関連が指摘されている *mobABD* 遺伝子クラスタが含まれることを見出した。このことは、*A. pasteurianus* と *A. pomorum* は近縁な種であるが、遺伝子の構成は明確に異なっているということを示しており、他の *A. pomorum* に特異的な遺伝子群の中にもショウジョウバエとの共生を維持するのに重要な

役割を果たす遺伝子群が存在することが強く示唆された。

16S rRNA の配列から推定することが困難な株間の系統関係をゲノム情報に基づく系統解析により推定した。その結果、2 つの耐熱株、386B と SKU1108 は互いに最も近縁であり、また日本由来の 3 つの株 NBRC 3277, NBRC 3278, NBRC 3280 は 1 つのクラスタ (グループ A) を形成しており、互いのゲノムの全長を比較しても数十から数百塩基ほどの違いしかないということが明らかとなった。

(3) 既知の情報からの耐熱性、酢酸発酵能などに寄与している遺伝子と表現型との関係

近縁株間で耐熱性の違いが生じる原因を解明するため、高い耐熱性を示す (耐熱株として定義できる) 386B と SKU1108 の完全長ゲノム配列と、これらよりも低い耐熱性を示す NBRC 3283 株 (非耐熱株と定義) の完全長ゲノム配列を比較した¹⁾。3 つの株に保存された既知の耐熱遺伝子 (耐熱性を保持するのに必須な遺伝子) に蓄積したアミノ酸置換を調べたところ、NBRC 3283 株に耐熱遺伝子の 1 つであるキサンチン脱水素酵素に構造を不安定化させるようなアミノ酸置換が見られた。また、キサンチン脱水素酵素のパラログ遺伝子が 386B と SKU1108 のみに保存されており、これらのアミノ酸置換とパラログ遺伝子が耐熱性の向上に寄与していると考えられた。

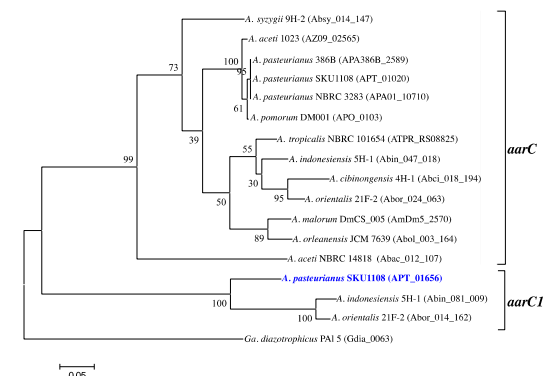


図 3 酢酸菌の AarC とそのパラログ AarC1 のアミノ酸配列による進化系統樹。

我々は以前 SKU1108 株の酢酸耐性期が短く、資化能が強いということを報告している。3 株のうち、SKU1108 のみから酢酸の資化に直接寄与している *aarC* 遺伝子のパラログ遺伝子 *aarC1* が見出された (図 3)。そのため SKU1108 の酢酸資化能が強いという形質にこのパラログ遺伝子が寄与することが示唆された。

日本由来の 3 つの株 NBRC 3277, NBRC 3278, NBRC 3280 からなるグループ A は一様に低い耐熱性を示していた (図 2)。これらの株に

ついて既知の耐熱遺伝子の欠損の有無について調べたところ、3株で共通にキサンチン脱水素酵素の遺伝子に遺伝子破壊的な変異が入り、機能を失っていることが明らかとなった。そのため、これらの破壊的変異がグループAの低い耐熱性と直接的に関係していることが強く示唆された。

(4) 個々の表現型を支配している遺伝子群、変異箇所についての実験的な検証

現在、比較ゲノムにより見出された表現型に影響を及ぼしうる遺伝子群についての実験的な検証を進めている。

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 9件)

1) Matsutani M, Hirakawa H, Hiraoka E, Theeragool G, Yakushi T, Matsushita K. Complete Genome Sequencing and Comparative Genomic Analysis of the Thermotolerant Acetic Acid Bacterium, *Acetobacter pasteurianus* SKU1108, Provide a New Insight into Thermotolerance. *Microbes Environ.* 2016 31(4):395-400. 査読有

2) Sainz F, Jesús Torija M, Matsutani M, Kataoka N, Yakushi T, Matsushita K, Mas A. Determination of Dehydrogenase Activities Involved in D-Glucose Oxidation in *Gluconobacter* and *Acetobacter* Strains. *Front Microbiol.* 2016 7:1358. 査読有

3) Soemphol W, Tatsuno M, Okada T, Matsutani M, Kataoka N, Yakushi T, Matsushita K. A novel Na⁽⁺⁾(K⁽⁺⁾)/H⁽⁺⁾ antiporter plays an important role in the growth of *Acetobacter tropicalis* SKU1100 at high temperatures via regulation of cation and pH homeostasis. *J Biotechnol.* 2015 211:46-55. 査読有

4) Charoenyingcharoen P, Matsutani M, Yakushi T, Theeragool G, Yukphan P, Matsushita K. A functionally critical single nucleotide polymorphism in the gene encoding the membrane-bound alcohol dehydrogenase found in ethanol oxidation-deficient *Gluconobacter thailandicus*. *Gene.* 2015 567:201-207. 査読有

5) Matsutani M, Ito K, Azuma Y, Ogino H, Shirai M, Yakushi T, Matsushita K. Adaptive mutation related to cellulose producibility in *Komagataeibacter*

medellinensis (*Gluconacetobacter xylinus*) NBRC 3288. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015 99:7229-7240. 査読有

6) Kataoka N, Matsutani M, Yakushi T, Matsushita K. Efficient Production of 2,5-Diketo-d-Gluconate via Heterologous Expression of 2-Ketogluconate Dehydrogenase in *Gluconobacter japonicus*. *Appl Environ Microbiol.* 2015 81:3552-3560. 査読有

7) Matsutani M, Suzuki H, Yakushi T, Matsushita K. Draft genome sequence of *Gluconobacter thailandicus* NBRC 3257. *Stand Genomic Sci.* 2014 9:614-623. 査読有

8) Matsutani M, Fukushima K, Kayama C, Arimitsu M, Hirakawa H, Toyama H, Adachi O, Yakushi T, Matsushita K. Replacement of a terminal cytochrome c oxidase by ubiquinol oxidase during the evolution of acetic acid bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 2014 1837:1810-1820. 査読有

9) Nishikura-Imamura S, Matsutani M, Insomphun C, Vangnai AS, Toyama H, Yakushi T, Abe T, Adachi O, Matsushita K. Overexpression of a type II 3-dehydroquinate dehydratase enhances the biotransformation of quinate to 3-dehydroshikimate in *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014 98:2955-2963. 査読有

[学会発表](計 6件)

1) 松谷峰之介、西倉 慎顕、秦野 智行、Saichana Natsaran、Masud-Tippayasak Uraivan、服部 浩美、貝沼(岡本) 章子、兼崎 友、石川 森男、片岡 尚也、薬師 寿治、松下一信 酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 の高温適応化株 TH-3 の発現解析から見える耐熱化機構の解明 第 11 回ゲノム微生物学会・総会、慶応義塾大学湘南藤沢キャンパス(神奈川県藤沢市)2017年3月2日~2017年3月4日

2) 松谷峰之介 ゲノムからみた酢酸菌の耐熱性と耐熱化、酢酸菌研究会・第8回研究集会、和歌山県・近畿大学 生物理工学部キャンパス(和歌山県紀の川市), 2016年11月5日

3) 松谷峰之介、山下隆司、古川藍子、辰野真木、貝沼(岡本)章子、石川森夫、志波優、吉川博文、平川英樹、薬師寿治、松下一信 酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* 12株のゲノム情報と耐熱性との相関に関する解析 第 10

回ゲノム微生物学会・総会，東京工業大学大岡山キャンパス（東京都港区）2016年3月4日～2016年3月5日

4) 松谷峰之介、平川英樹、薬師寿治、松下一信 耐熱性酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 (NBRC 101655) 株の完全長ゲノム配列の決定および比較ゲノム解析 第7回酢酸菌研究会、東京大学農学部（東京都文京区）2015年10月10日

5) 松谷峰之介、伊藤光平、東慶直、荻野英賢、白井睦訓、薬師寿治、松下一信 酢酸菌 *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 株のセルロース非生産株から生産株への復帰機構の解明 第9回ゲノム微生物学会・総会，神戸大学六甲第2キャンパス（兵庫県神戸市）2015年3月6日～2015年3月8日

6) 松谷峰之介，伊藤光平，東慶直，荻野英賢，白井睦訓，薬師寿治，松下一信 酢酸菌 *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 のセルロース非生産株から生産株への適応変異 日本乳酸菌2014年度 酢酸菌研究会第6回研究集会合同シンポジウム、神奈川 日本大学藤沢キャンパス（神奈川県藤沢市）2014年12月5日

〔図書〕(計 1件)

1) Kazunobu Matsushita & Minenosuke Matsutani: Chapter 7. Distribution, evolution and physiology of oxidative fermentation, "Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology", K. Matsushita et al., (eds) Springer, pp. 350 (159-178) (2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松谷峰之介 (MATSUTANI MINENOSUKE)

山口大学・大学院創成科学研究科・学術研究員

研究者番号：70380558

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし