

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18673

研究課題名(和文) 次世代発酵技術のための酸化発酵の理解：追隨する細胞内代謝の制御

研究課題名(英文) Understanding of oxidative fermentation for next-generation fermentation technology: Regulation of intracellular metabolism following oxidative fermentation

研究代表者

阿野 嘉孝 (Ano, Yoshitaka)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：00403642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸化発酵は、高速高効率な微生物変換系であり、次世代発酵技術の基盤として期待されている。本研究では、酢酸菌細胞外での酸化反応の後に進行する細胞内資化系に焦点を当て、その制御機構を明らかにすることを目指した。本研究では、5ケトグルコン酸(5KGA)発酵をモデルとして、以下の成果を得た。(1)5KGAの細胞内輸送に関わる分子を見出した。(2)5KGA資化の発現には、輸送体分子の機能より細胞内資化系の活性化が重要であった。(3)5KGA生産時に発現する制御因子を見出し、本分子が追隨して進行する細胞内代謝に重要であることを示した。これらの成果は、安定な5KGA酸化発酵系の構築に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Oxidative fermentation is a rapid and effective microbial conversion and is expected as next-generation fermentation technology. In this study, we focused on intracellular assimilation pathway which progresses after extracellular oxidation in acetic acid bacteria to clarify its regulation system. This study provided the following results using 5-ketogluconate (5KGA) fermentation as a model fermentation. (1) We found transporter involved in 5KGA uptake. (2) Activation of intracellular 5KGA metabolism was more important than induction of 5KGA transporter for induction of 5KG assimilation. (3) We found transcriptional regulator related on 5KGA assimilation. These data will lead to improvement of industrial production of 5KGA.

研究分野：応用微生物学

キーワード：酢酸菌 酸化発酵 発酵生産 代謝制御

1. 研究開始当初の背景

「酸化発酵」は、多彩な糖類を細胞外で強力に酸化して、ほぼすべての酸化生成物を培地中に蓄積する酢酸菌に特徴的な代謝系である。本代謝系は次世代発酵技術の基盤としても魅力ある反応系であり、その理解が求められている。

最近、自然発生的変異株が単離され、酸化発酵に追隨して、蓄積した生成物を細胞内に取り込み、資化・再増殖する現象が確認された。このことは、酢酸菌は酸化生成物の資化能を有しているにも関わらず、潜在的に抑制して酸化発酵を進めていることを示し、生理学的に興味深い。

本研究課題では、酸化発酵を利用する上で新たな課題として見出された「追隨して進行する細胞内代謝」の分子機構を解明して酸化発酵の理解を深め、その知見を新規発酵技術に展開することを目指した。

2. 研究の目的

本研究課題では、「追隨して進行する細胞内代謝」の分子機構を明らかにするために、産業的に有用な化学素材 5-ケトグルコン酸 (5KGA) の発酵生産における自然発生変異株の代謝挙動に着目し、5KGA の細胞外での酸化発酵的生成から最終酸化産物である 5KGA の細胞内輸送・資化へと代謝変化を導く分子群を同定して、その機能調節メカニズムの解明することを目指した。

3. 研究の方法

本研究計画では、5KGA 発酵をモデルとして、酸化発酵における最終酸化生成物を細胞内へ輸送・資化に導く分子群の機能調節メカニズムを明らかにして、次世代バイオリアファイナリー技術の構築のための科学基盤を得るために、以下の3つの実験を行った。

(1) 5KGA の資化に関わる分子群、とくに5KGA の細胞内輸送に関わる遺伝子の探索と同定

(2) 自然発生変異株の変異箇所の同定と関連分子の生化学的解析

(3) 定量的リアルタイム PCR による転写調節の解析と代謝変化を誘引するシグナルの特定

4. 研究成果

(1) 5KGA の資化に関わる分子群、とくに5KGA の細胞内輸送に関わる遺伝子の探索と同定

ゲノム公開株について希少糖5KGAの細胞内輸送に関わる輸送体遺伝子の特定に注力した。ゲノム情報から、5KGA 資化に関わる酵素近傍に位置する推定輸送体遺伝子に着目し破壊株を作成した。野生株は生成した5KGAを細胞内に取り込んで再増殖するのに対し、遺伝子破壊株は、培地中に安定に5KGAを蓄積するようになり再増殖はみられなかった。自然発生変異株についても、当該遺伝子の破壊により5KGAの安定生産が可能とな

ったことから、本遺伝子が5KGAの細胞内輸送に寄与していることが明らかとなった。興味深いことに、公開されている酢酸菌のゲノムを広く調査すると、本遺伝子の相溶性および周辺遺伝子の配座に基づいて2つのタイプに分類でき、このタイプの違いが5KGA輸送能に密接に関係していることを見出した。

(2) 自然発生変異株の変異箇所の同定と関連分子の生化学的解析

(1)で特定に成功した希少糖 5-ケトグルコン酸 (5KGA) の細胞内輸送に関わる輸送体遺伝子について、塩基配列を調査して比較解析を行った。ゲノム公開株と比較すると輸送体遺伝子に数塩基のミスマッチが確認されたが、自然発生変異株間では完全に一致していた。このことから、「酸化発酵に追隨して進行する細胞内代謝」は輸送体遺伝子の変異に起因するものでないと判断した。現在、転写調節因子の変異を視野に入れて、変異箇所の同定に取り組んでいる。

一方、5KGA 輸送体遺伝子について、破壊株を用いて基質の取り込み能を調査した。本分子は5KGAだけでなくグルコン酸に対する取り込み能を示したが、2-ケトグルコン酸 (2KGA) は全く取り込むことがなかった。以上のことから、本分子は5KGAおよびグルコン酸の取り込みに機能していることを明らかにした。

(3) 定量的リアルタイム PCR による転写調節の解析と代謝変化を誘引するシグナルの特定

(2)の結果より、5KGA の細胞内代謝には、5KGA の細胞内輸送分子および5KGA 代謝酵素の発現誘導に関わる転写因子の存在が示唆された。この転写因子が、輸送体と同様にグルコン酸代謝関連転写調節因子が関与することを推測し、そのホモログの探索を行った。ゲノム上には複数の候補遺伝子が見つかったが、5KGA 生産条件下で特に発現が誘導された因子が見つかった。当該遺伝子の欠失破壊では、5KGA の取込・資化に遅延が生じ、5KGA の「追隨して進行する細胞内代謝」の中核であることを明らかにした。

一方、定量的リアルタイム PCR の結果、転写因子破壊株では、輸送体分子および代謝酵素の発現が抑制されていたが、完全に停止することはなかった。以上のことから、5KGA の細胞内代謝は複雑な制御下にあることが伺い知れた。現在、当該転写調節因子がどのようなシグナルを検知しているのか、その特定に取り組んでいるところである。

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 1 件)

Ano Y, Hours RA, Akakabe Y, Kataoka N, Yakushi T, Matsushita K, Adachi O., Membrane-bound glycerol dehydrogenase catalyzes oxidation of D-pentones to 4-keto-D-pentones, D-fructose to 5-keto-D-fructose, and D-psicose to 5-keto-D-psicose. *Biosci Biotechnol Biochem.* 査読有 81(2):411-418(2017).

[学会発表](計 29 件)

三由綾香, 内藤朋子, 阿野嘉孝, 酢酸菌の酸化発酵におけるシアン耐性呼吸鎖の役割, 日本農芸化学 2018 年度大会, 2018 年 3 月 17 日, 名城大学, 愛知

宇都宮大貴, 三井亮司, 阿野嘉孝, *Acidomonas* 属酢酸菌のランタノイド依存性メタノール酸化系の役割, 日本農芸化学会 2018 年度大会(2018 年 3 月 17 日, 名城大学, 愛知

西江百加, 三宅誠人, 阿野嘉孝, *Acidomonas* 属酢酸菌のグリセロール酸化に寄与する酵素, 第 8 回愛媛微生物学ネットワークフォーラム, 2017 年 10 月 28 日, 愛媛大学, 愛媛

和田征太郎, 西原彬, 阿野嘉孝, *Gluconobacter* 属酢酸菌の 5-ケトグルコン酸資化を誘導する制御因子の探索, 第 8 回愛媛微生物学ネットワークフォーラム, 2017 年 10 月 28 日, 愛媛大学, 愛媛

三由綾香, 内藤朋子, 阿野嘉孝, 酢酸菌の酸化発酵におけるシアン耐性呼吸鎖の機能解析, 第 8 回愛媛微生物学ネットワークフォーラム, 2017 年 10 月 28 日, 愛媛大学, 愛媛

宇都宮大貴, 阿野嘉孝, *Acidomonas* 属酢酸菌のレアース存在下で機能するエタノール酸化系の解析, 酢酸菌研究会第 9 回研究集会, 2017 年 10 月 14 日, 半田市民交流センター, 愛知

三宅誠人, 齊宮史佳, 阿野嘉孝, 微細緑藻における油脂生産時の葉緑体分解, 第 69 回日本生物工学会大会, 2017 年 9 月 12 日, 早稲田大学,

東京

宇都宮大貴, 山本麻衣子, 三井亮司, 阿野嘉孝, *Acidomonas* 属酢酸菌のレアースに対する応答, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 18 日, 京都女子大学, 京都

Salakkam A, Ano Y, Production of ptygalacturonase by thermotolerant *Aspergillus* sp. TPG-01: effect of substrate particle size., The 2nd Joint Seminar, New Core to Core Program A, 2016 年 11 月 14 日, Chonburi, Thailand.

Ano Y, Tamai H, Hara K, Salakkam A, Biooxidation of uronic acid by acetic acid bacteria, The 2nd Joint Seminar, New Core to Core Program A, 2016 年 11 月 14 日, Chonburi, Thailand.

阿野嘉孝, 高田悠斗, 中野航, 松下一信, キノプロテイン・グリセロール脱水素酵素はメタルによって至適 pH が変化する, 酢酸菌研究会第 8 回研究集会, 2016 年 11 月 5 日, 近畿大学, 和歌山

西原彬, 阿野嘉孝, *Gluconobacter frateurii* NBRC 3285 の分断した GntP は 5KGA の取り込みに関与する, 酢酸菌研究会第 8 回研究集会, 2016 年 11 月 5 日, 近畿大学, 和歌山

宇都宮大貴, 山本麻衣子, 阿野嘉孝, レアースは *Acidomonas* 属酢酸菌の ADH 発現を抑制する, 酢酸菌研究会第 8 回研究集会, 2016 年 11 月 5 日, 近畿大学, 和歌山

宇都宮大貴, 山本麻衣子, 阿野嘉孝, レアースによるメチロトロフ酢酸菌の代謝制御, 第 7 回愛媛微生物学ネットワークフォーラム, 2016 年 10 月 29 日, 松山大学, 愛媛

齊宮史佳, 三宅誠人, 阿野嘉孝, 微細緑藻における油脂生産時の葉緑体分解機構の解析, 第 7 回愛媛微生物学ネットワークフォーラム, 2016 年 10 月 29 日, 松山大学, 愛媛

原圭佑, 玉井秀樹, Apilak Salakka, 阿野嘉孝, 酢酸菌の PQQ 依存性ウロン酸脱水素酵素とアルダル酸生産, 第 7 回愛媛微生物学ネットワークフォーラム, 2016 年 10 月 29 日, 松山大学, 愛媛

藤井真央, 西原彬, 阿野嘉孝,
Gluconobacter 属酢酸菌における D-アル
ドペントース酸化に関わる PQQ 酵素,
第 7 回愛媛微生物学ネットワークフォー
ラム, 2016 年 10 月 29 日, 松山大学, 愛
媛

西原彬, 阿野嘉孝, *Gluconobacter* 属
酢酸菌の 5-ケトグルコン酸輸送体の特定
と特徴づけ, 第 7 回愛媛微生物学ネット
ワークフォーラム, 2016 年 10 月 29 日,
松山大学, 愛媛

西原彬, 片岡尚也, 薬師寿治, 松下一信,
阿野嘉孝, *Gluconobacter* 属酢酸菌にお
ける 5-ケトグルコン酸輸送体分子と資
化能との関係, 日本農芸化学会 2016 年
度大会, 2016 年 3 月 30 日, 札幌コンベン
ションセンター, 北海道

足立収生, RA. Hours, 赤壁善彦, 阿
野嘉孝, 品川恵美子, 片岡尚也, 薬師
寿治, 松下一信, 酢酸菌における複数
の新規な PQQ-酵素の同定, 日本農芸化
学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 29 日,
札幌コンベンションセンター, 北海道

②① 西原彬, 阿野嘉孝, *Gluconobacter* 属
酢酸菌の 5-ケトグルコン酸輸送体の探
索, 第 6 回愛媛微生物学ネットワー
クフォーラム, 2015 年 10 月 24 日, 松山大
学, 愛媛

②② 山本麻衣子, 阿野嘉孝, 松下一信,
Acidomonas 属酢酸菌のシトクロム *c* 酸
化酵素, 第 6 回愛媛微生物学ネットワ
ークフォーラム, 2015 年 10 月 24 日,
松山大学, 愛媛

②③ 三好政裕, 阿野嘉孝, 希土類金属の
酢酸菌エネルギー代謝への影響, 第 6
回愛媛微生物学ネットワークフォーラ
ム, 2015 年 10 月 24 日, 松山大学,
愛媛

②④ 三宅誠人, 阿野嘉孝, 微細緑藻にお
ける葉緑体減少と油脂生産の関係, 第
6 回愛媛微生物学ネットワークフォーラ
ム, 2015 年 10 月 24 日, 松山大学, 愛媛

②⑤ 西原彬, 阿野嘉孝, *Gluconobacter* 属
酢酸菌の 5-ケトグルコン酸輸送体の探
索, 酢酸菌研究会第 7 回研究集会,
2015 年 10 月 10 日, 松山大学, 愛媛

②⑥ 山本麻衣子, 阿野嘉孝, 松下一信,
Acidomonas 属酢酸菌のシトクロム *c* 酸
化酵素, 酢酸菌研究会第 7 回研究集会,
2015 年 10 月 10 日, 松山大学, 愛媛

②⑦ 西原彬, 片岡尚也, 薬師寿治, 松下
一信, 阿野嘉孝, 自然発生的変異に
よる酢酸菌のケトグルコン酸代謝の変
換, 日本農芸化学会 2015 年度中四
国・西日本支部合同大会, 2015 年 9 月
18 日, 愛媛大学, 愛媛

②⑧ 数田皓平, 数井彩加, 松谷峰之介,
薬師寿治, 松下一信, 阿野嘉孝,
Gluconobacter thailandicus に見出さ
れた *sidBA* パラログ遺伝子の機能解析,
日本農芸化学会 2015 年度中四国・西日
本支部合同大会, 2015 年 9 月 18 日, 愛
媛大学, 愛媛

②⑨ 山本麻衣子, 薬師寿治, 松下一信,
阿野嘉孝, *Acidomonas methanolica*
がもつ B 型シトクロム *c* オキシダ
ーゼの酵素学的特徴, 第 56 回日本生
化学会中国四国支部例会, 2015 年 5
月 29 日, 島根大学, 島根

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.agr.ehime-u.ac.jp/~hakko/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿野 嘉孝 (ANO, Yoshitaka)

愛媛大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 00403642