

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14776

研究課題名（和文）酢酸菌におけるリン脂質アシル鎖の構造依存的な酢酸応答メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the acetic acid response mechanism depending on the phospholipid acyl chain structure of acetic acid bacteria

研究代表者

豊竹 洋佑（Toyotake, Yosuke）

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：60843977

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：Acetobacter 属酢酸菌のエタノールストレス応答、酢酸ストレス応答における細胞膜脂肪酸の構造と機能の新しい相関を見いだした。酢酸菌が生産する不飽和脂肪酸が持つ生理的重要性を示すとともに、酢酸菌が環境中の遊離脂肪酸を特定の脂質に取り込んで、外部ストレスに対応していることを示唆する結果を得た。また、Acetobacter 属酢酸菌がリン脂質合成に関わる AGPAT ファミリータンパク質を3種有しており、そのうちの一つが本菌の酸ストレス耐性に寄与することを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酢酸菌のストレス応答戦略を明らかにする試みは古くから行われてきたが、膜脂質の観点からの研究は現象の観察に留まり、膜脂質の分子レベルでの機能の理解は進んでいない。本研究は、酢酸菌の膜脂肪酸が担う構造依存的な生理的役割の一端を明らかにし、ストレス応答に関与する機能未知の脂質代謝関連遺伝子を新たに発見した点で意義がある。また、本研究で培養環境に含まれる特定の成分（脂肪酸）が酢酸菌の発酵生理に与える新奇な現象を捉えたことから、発酵プロセス開発に新しい視点を提供する可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：We found a new correlation between the structure and function of plasma membrane fatty acids in the ethanol and acetic acid stress responses of Acetobacter species. Our results indicate the physiological importance of unsaturated fatty acids produced by Acetobacter species and suggest that Acetobacter species respond to external stress by incorporating free fatty acids according to their structures from the environment into specific lipids. We also found that Acetobacter species possess three AGPAT family proteins involved in phospholipid biosynthesis, one of which contributes to the acid stress tolerance.

研究分野：発酵微生物学

キーワード：酢酸菌 エタノール応答 酢酸応答 環境ストレス応答 細胞膜 脂肪酸 アシル転移酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食酢の醸造は酢酸菌を利用した発酵技術の一つであり、日本でも古くから受け継がれてきた。この醸造過程で、発酵熱・高濃度のアルコール・強い酸性条件など、様々なストレスが生じる。しかし、これらのストレスに対する酢酸菌の応答戦略の分子メカニズムには、依然多くの謎が残されている。酢酸菌はエタノールを基質として酢酸を生産する。発酵が進むにつれて、培地中のエタノールが酢酸に置き換わることから、各物質が異なるストレスを同時に細胞に与えることが考えられた。このため、野生株のストレス応答を観察するだけでは、エタノールと酢酸の個別の影響を区別することが難しく、各ストレスに対する特異的な応答を見逃してしまう可能性があった。これを克服するためには、エタノールと酢酸への応答を区別して解析できる新しい手法が必要であった。

外部環境と直接触れる部分である細胞膜とストレス応答には密接な関係があると考えられることから、酢酸菌の膜脂質の分子機能に注目が寄せられてきた (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2015) **99**, 6215)。先行研究により、酢酸菌が主として生合成する *cis*-バクセン酸 (18:1) が、膜リン脂質に含まれる全アシル鎖の過半数を占めることが確認されている (*Extremophiles* (2007) **11**, 627)。しかし、このような酢酸菌特有の膜リン脂質アシル鎖組成がもつ生理的意義については、まだ十分に理解されていない。また、この不飽和に偏った膜リン脂質アシル鎖組成の形成メカニズムについても、その分子実態は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

野生株におけるエタノール・酢酸応答と、酢酸発酵能を失った変異株におけるエタノール応答を比較分析することで、各ストレスに対する特異的な細胞応答を見だし、その分子メカニズムを明らかにすることを旨とした。この時、酢酸菌が不飽和脂肪酸を膜に豊富に蓄積していることから、その構造特異的なストレス応答メカニズムに焦点を当てて解析を進めた。また、酢酸菌が不飽和脂肪酸を多く膜に蓄積するメカニズムを明らかにするべく、脂肪酸やリン脂質生合成に関与する酵素の機能解析に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用菌株、培養条件、遺伝子操作

遺伝子組換えの成功実績が豊富なモデル酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 を研究対象とした (*J. Biosci. Bioeng.* (2019) **127**, 690)。本菌は山口大学の薬師寿治教授より分譲いただいた。酢酸発酵能を失ったアルコール脱水素酵素欠損株 ( $\Delta adhAB$ ) は、5-フルオロシトシンを薬剤選択マーカーとして用いるネガティブセレクションにより作製した。培養には、必要に応じてエタノールや酢酸を添加した YPG 培地 (Yeast extract 0.5%、Peptone 0.5%、Glycerol 1%) を利用した。

#### (2) 脂肪酸添加実験

鎖長や二重結合の有無が異なる数種類の脂肪酸をそれぞれ培地に添加し、エタノールや酢酸存在下で、野生株および  $\Delta adhAB$  株の生育への影響を調べた。添加した脂肪酸は *cis*-バクセン酸 (18:1)、パルミトレイン酸 (16:1)、ミリストレイン酸 (14:1)、ステアリン酸 (18:0)、パルミチン酸 (16:0)、ミリスチン酸 (14:0) である。

#### (3) 脂質分析

脂肪酸添加実験で得られた各菌体細胞から Bligh-Dyer 法 (*Can. J. Biochem. Physiol.* (1959) **37**, 911) で全脂質を抽出し、ナトリウムメトキシドを用いたメタノリシス反応に供した。得られたメチル化脂肪酸はガスクロマトグラフィー質量分析に供した。また、薄層クロマトグラフィーを利用して、抽出した全脂質からホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルグリセロール (PG)、カルジオリピン (CL) を分画し、それぞれのアシル鎖組成を上記のプロセスを通して調べた。

#### (4) 膜流動性解析

上記で得られた全脂質からリポソームを調製した。リポソームの粒子径は、エクストルーダー (Avanti Polar Lipids 社製) を使った押出処理によって、約 100 nm に揃えた。得られたリポソームに蛍光プローブであるピレンを取り込ませ、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて蛍光測定した。流動性の評価には、360 nm と 490 nm での蛍光強度の比を用いた。生細胞を用いた解析も検討したが、スフェロプラスト調製の検討が進まず、断念した。

#### (5) *A. pasteurianus* SKU1108 由来脂肪酸合成酵素の *in vivo* 活性

多くのグラム陰性細菌の場合、FabA と FabB の働きにより、脂肪酸生合成の過程で *cis*-型二重結合が導入される。しかし酢酸菌は 18:1 を細胞膜に多く含むにも関わらず、そのゲノムには、二重結合導入に関わる既知の遺伝子が見当たらない。一方で、酢酸菌由来の FabZ と FabA 間に

は約 20%、FabF と FabB 間には約 40%の配列相同性が認められた。このことから、酢酸菌では FabZ がデヒドラターゼ活性だけでなくイソメラーゼ活性も持ち、*trans*-2-エノイル ACP を *cis*-3-エノイル ACP に変換する可能性が考えられた。また、FabF が *cis*-3-エノイル ACP の鎖長伸長反応を担うことも想定された。そこでこの仮説を検証するため、大腸菌 FabA または FabB の温度感受性変異株内で、SKU1108 株由来の FabZ と FabF をそれぞれ発現させ、温度感受性変異が相補されるかを調べた。なお、発現プラスミドは L-アラビノースで誘導可能な pBAD28 を利用し、温度感受性変異株とともにナショナルバイオリソースプロジェクトから入手した。

#### (6) *A. pasteurianus* SKU1108 由来機能未知 AGPAT ファミリー酵素群の機能解析

*Acetobacter* 属酢酸菌には、AGPAT (1-acylglycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase) ファミリーに属する機能未知タンパク質が 3 つ存在する。大腸菌由来の AGPAT ホモログである PlsC と同様に、保存モチーフである HXXXXD 配列を有していることから、これらの酵素を ApPlsC1 から ApPlsC3 と命名した。ApPlsC1~3 の *in vivo* での活性評価には、PlsC の温度感受性変異株である大腸菌 JC201 (*J. Biol. Chem.* (1990) **265**, 17215) を用いた。各酵素の発現には、上記の pBAD28 を利用した。また、ApPlsC1 や PlsC の *in vivo* 基質特異性を調べるため、ApPlsC1 や PlsC を発現させた JC201 株のリン脂質をホスホリパーゼ A2 で加水分解し、得られた *sn*-2 位由来の脂肪酸をガスクロマトグラフィー質量分析で調べた。また(1)で記述した方法に従い、ApPlsC1 から ApPlsC3 をコードする各遺伝子欠損株の作製に取り組んだ。できた欠損株については、その表現型を種々のストレス条件下で調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) モノ不飽和脂肪酸 (MUFA) の鎖長依存的な成長促進効果

18:1、16:1、14:1 の各 MUFA を添加したエタノール含有 YPG 培地で *A. pasteurianus* SKU1108 の野生株を培養した結果、MUFA の鎖長が短いほど本菌の生育が促進された。一方、同じ MUFA を添加した YPG 培地および酢酸含有 YPG 培地では、生育促進効果は観察されなかった。以上の結果から、MUFA の生育促進効果はエタノールの存在に依存することが示された。飽和脂肪酸である 18:0、16:0、14:0 を添加して培養した場合は、エタノール含有培地を含む全ての条件で生育促進効果が見られなかった。次に  $\Delta adhAB$  株を用いて同様の実験を行ったところ、 $\Delta adhAB$  株においても MUFA を添加したエタノール含有培地でのみ生育促進効果が見られた。 $\Delta adhAB$  株はエタノールを酢酸に変換しないことから、この結果は MUFA が本菌のエタノールストレス応答に特異的に寄与することを示唆している。さらに、野生株と  $\Delta adhAB$  株のどちらを培養した場合でも、18:1 と比較して 16:1、14:1 の順に生育促進効果が強くなったことから、短鎖の MUFA の方がエタノール存在下での生育促進に効果的であることが明らかとなった。

添加した脂肪酸が細胞膜の構成成分として利用されているかを調べるため、まず各培養条件で得られた菌体から全膜脂質を抽出した。続いて、塩基性触媒を用いて脂肪酸メチルエステルを調製後、ガスクロマトグラフィー質量分析でエステル脂質由来のアシル鎖組成を明らかにした。その結果、MUFA を添加したエタノール含有培地で培養した場合でのみ、添加した脂肪酸が構造を保ったまま膜に取り込まれることが分かった。さらに、添加した MUFA の鎖長が短くなるほど、その全脂肪酸の中で占める割合が増加することが確認された。具体的には、18:1 を添加した場合、その相対値は 75.5% から 83.7% に、16:1 を添加した場合、その相対値は 0% から 37.3% に、14:1 を添加した場合、その相対値は 0% から 63.2% に増加した。 $\Delta adhAB$  株でも同様の実験を行ったところ、18:1 の相対値が 78.7% から 86.0% に、16:1 が 3.2% から 23.2% に、14:1 が 0% から 38.2% に増加した。以上の結果から、野生株と  $\Delta adhAB$  株の脂肪酸取り込み量を比較すると、18:1 の取り込み量は  $\Delta adhAB$  株で増加し、16:1 と 14:1 の取り込み量は減少したことが示唆された。

添加した脂肪酸がどのリン脂質分子種のアシル鎖として利用されるかを明らかにするため、全膜脂質から単離したリン脂質 (PC、PE、PG、CL) それぞれにおけるアシル鎖組成を調べた。14:1 を外部から取り込んだ野生株由来のサンプルを調べたところ、各リン脂質を構成する全アシル鎖中の 14:1 の相対値は、PE で 0%、PG で 4.4%、PC で 10.1%、CL で 25.5% だった。14:1 は本菌によって合成されないことから、上記の値が大きいほど、外部から供給された 14:1 がより多くリン脂質に組み込まれたことを示唆する。以上の結果から、本菌が生産する 4 種のリン脂質の中で、CL に最も多くの 14:1 が組み込まれる傾向が見いだされた。一方、同じ条件で培養した  $\Delta adhAB$  株由来のサンプルを調べたところ、どのリン脂質画分からも 14:1 は検出されなかった。このことから、エタノール存在下で  $\Delta adhAB$  株に 14:1 を与えた場合、リン脂質以外の脂質分子の構成要素として 14:1 が取り込まれる可能性が示唆された。

#### (2) 膜流動性解析

14:1 を外部から取り込んだ野生株もしくは  $\Delta adhAB$  株由来の全膜脂質サンプルから、それぞれリポソームを調製し、ピレンの蛍光測定から膜の流動性を評価した。その結果、野生株と  $\Delta adhAB$  株のどちらに由来するサンプルを測定した場合でも、何も取り込ませなかった菌体由来の膜脂質から調製したリポソームよりも高い流動性を示した。このことから、本菌がエタノールや酢酸ストレスに応答し、外部から MUFA を膜に取り込むことで、その流動性を変化させていることが示唆された。

### ( 3 ) *A. pasteurianus* SKU1108 由来 FabZ と FabF (ApFabZ と ApFabF) の *in vivo* 活性

大腸菌の FabA および FabB の温度感受性変異株に対し、L-アラビノース添加によって ApFabZ または ApFabF を高発現するプラスミドをそれぞれ導入した。そして、L-アラビノースを添加した LB 培地での非許容温度における生育を調査した。その結果、温度感受性変異株の生育不全は抑制されなかった。このことから、ApFabZ や ApFabF はそれぞれ *in vivo* での FabZ 活性や FabF 活性を持たないことが示唆された。

### ( 4 ) *A. pasteurianus* SKU1108 由来 AGPAT ホモログの生理機能

大腸菌の PlsC の温度感受性変異株内で、SKU1108 株に見出された 3 種の AGPAT ホモログ、ApPlsA1 から ApPlsC3 をそれぞれ発現させた。発現には、上記と同様に L-アラビノース添加によって誘導がかかる pBAD28 プラスミドを利用した。そして、L-アラビノースを添加した LB 培地での非許容温度における生育を調査した。その結果、ApPlsC1 を発現させた場合でのみ、生育不全が抑制された。このことから、ApPlsC1 のみが PlsC 活性を有していることが示唆された。次に、ApPlsC1 高発現株と PlsC 高発現株のリン脂質 *sn*-2 位のアシル鎖組成を解析した。その結果、ApPlsC1 高発現株では 18:1 の相対量が PlsC 高発現株と比較して有意に高かった。このことから、ApPlsC1 は 18:1 に対する活性が PlsC よりも高いと考えられた。

*A. pasteurianus* SKU1108 の細胞内で ApPlsC1~3 がどのような機能を持つのかを明らかにするため、それぞれの遺伝子の欠損株作製に取り組んだ。その結果、ApPlsC2 と ApPlsC3 の遺伝子欠損株 ( $\Delta ApplsC2$  と  $\Delta ApplsC3$ ) の作製に成功した。一方、ApPlsC1 の遺伝子欠損株 ( $\Delta ApplsC1$ ) の獲得には至らなかった。このことから、ApPlsC1 の欠損は、本菌にとって致死であることが示唆された。続いて、得られた  $\Delta ApplsC2$  と  $\Delta ApplsC3$  の生育特性を親株と比較した。 $\Delta ApplsC2$  はどの培養条件でも生育に差を示さなかったが、 $\Delta ApplsC3$  はエタノール存在下、あるいは酢酸存在下で有意な生育不全を示した。このことから、ApPlsC3 は本菌のエタノール・酢酸ストレス応答に重要であることが示唆された。一方、寒天培地上でのコロニー形成能を指標にストレス応答を調べた結果、塩酸で pH を低下させた酸性条件下や高温環境下、界面活性剤存在下で  $\Delta ApplsC3$  のみが感受性を示した。このことから、ApPlsC3 が本菌の酸ストレス耐性に重要であることや、ApPlsC3 の欠損により、本菌の細胞膜の安定性に変化が生じたことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口百萌花, 松井大亮, 若山守, 豊竹洋佑
2. 発表標題 酢酸菌由来リゾリン脂質アシル基転移酵素ホモログ群の生理機能解析
3. 学会等名 第24回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豊竹洋佑, 山本翔太, 原悠一郎, 河股優輔, 松井大亮, 若山守
2. 発表標題 酢酸菌由来ホスファチジルコリンの生理機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊竹洋佑, 山本翔太, 原悠一郎, 辻茜, 河股優輔, 松井大亮, 若山守
2. 発表標題 ホスファチジルコリンが制御する酢酸菌生体膜機能の解析
3. 学会等名 第23回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山川和奏, 豊竹洋佑, 辻茜, 松井大亮, 若山守
2. 発表標題 酢酸菌由来スクアレン環化酵素ホモログの生理機能解明
3. 学会等名 第23回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山川和奏, 辻茜, 松井大亮, 若山守, 豊竹洋佑
2. 発表標題 酢酸菌におけるスクアレン環化酵素ホモログ群の生理機能比較
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部例会 (第523回講演会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原悠一朗, 山本翔太, 辻茜, 河股優輔, 松井大亮, 若山守, 豊竹洋佑
2. 発表標題 酢酸菌細胞膜におけるホスファチジルコリンが担う生理機能の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部例会 (第523回講演会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻茜, 豊竹洋佑, 河股優輔, 足立海稀, 松井大亮, 若山守
2. 発表標題 Acetobacter 属酢酸菌における酢酸発酵ストレスに特異的な膜脂質の応答
3. 学会等名 第67回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻茜, 豊竹洋佑, 河股優輔, 山本翔太, 松井大亮, 若山守
2. 発表標題 Acetobacter pasteurianus SKU1108 における細胞膜リン脂質の生理機能解析
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------