

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580115

研究課題名(和文) 酢酸菌が行う酢酸発酵における残された課題：アセトアルデヒド酸化に関する研究

研究課題名(英文) The oxidation of acetaldehyde: an issue remained unclear in the acetic acid fermentation

研究代表者

薬師 寿治 (Yakushi, Toshiharu)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30324388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)： 酢酸菌が行う酢酸発酵は、微生物によるエタノールから酢酸への物質変換である。本研究では、酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* においてアルデヒドの酸化を担うアルデヒド脱水素酵素ALDHの遺伝学的・生化学的解析を行った。本菌には、酢酸発酵に主体的に関わるカノニカルALDHと酢酸発酵にあまり貢献できないパラログALDHの二つの酵素を持つことが明らかとなった。至適pHやアセトアルデヒドに対する親和性という観点でも二つの酵素は特徴を持っていた。パラログALDHは複合体として精製することができたが、カノニカルALDHは不安定であると考えられた。

研究成果の概要(英文)： Acetic acid fermentation by acetic acid bacteria is a typical microbial transformation from ethanol to acetic acid. The present study conducted genetic and biochemical analyses on aldehyde dehydrogenase (ALDH) catalyzing oxidation of acetaldehyde into acetic acid in *Acetobacter pasteurianus*, a member of acetic acid bacteria. It was shown that *A. pasteurianus* has two kinds of ALDH complexes: canonical one is essential for acetic acid fermentation, but paralogous one less contributes to that. Two ALDH complexes were different from each other as to pH optima and affinities to acetaldehyde. The paralogous ALDH was purified as complex consists of three subunits, but canonical ALDH seemed to be unstable and prone to be decomposed into subunit level.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：酢酸発酵 酢酸菌 アセトアルデヒド アルデヒド脱水素酵素 パラログ 膜タンパク質 ユビキノン 遺伝子破壊

1. 研究開始当初の背景

酢酸菌が行う酢酸発酵は、古くから人類に親しまれてきた発酵（微生物による物質変換）である。アルコール発酵がいわゆる嫌気発酵で進行するのに対して酢酸発酵は好気発酵（酸化発酵）で進行する特徴がある。酢酸菌の細胞質膜の外側に存在するアルコール脱水素酵素（ADH）がエタノールからアセトアルデヒドへの酸化を行い、やはり細胞質膜の外側に存在するアルデヒド脱水素酵素（ALDH）がアセトアルデヒドから酢酸への酸化を担う。この結果、エタノールは速やかに酢酸に酸化される。両酵素は基質の酸化反応に共役して膜中に存在するユビキノンを還元する。還元型のユビキノロン（ユビキノール）は、ユビキノール酸化酵素によって再酸化されるが、その際ユビキノール酸化酵素は酸素を水に還元する。このように、エタノールが酸素に依存して酢酸にまで酸化される酸化発酵が酵素のレベルできちんと記述できるに至った。

ALDH の精製に関しては、人工電子受容体を用いた酵素活性測定法に基づいて、1980年に酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* から最初の報告がなされ、以降、*Acetobacter* 属酢酸菌を含むいくつかの菌種から ALDH が精製された。1997年には、酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* から ALDH の構造遺伝子 (*aldFGH*) がクローニングされ、その全貌が明らかになった。その後、2005年に報告された *Gluconobacter oxydans* の全ゲノムや、私たちの研究室等が報告した *Acetobacter pasteurianus* のゲノム、その他の酢酸菌ゲノムにも本遺伝子は保存されていたため、*aldFGH* 遺伝子の重要性が確認された。

しかしながら意外なことに、*aldFGH* 遺伝子産物である ALDH が、実際に酢酸発酵に関わっていることを示した報告は無いに等しい。また、精製した ALDH のユビキノロン還元活性についても報告はない。つまり、人工電子受容体の還元活性を指標に精製された ALDH が、実際に本菌の呼吸鎖で機能しているのか、生化学的にも遺伝学的にも示されていない。本研究では、酢酸菌の行う酢酸発酵への ALDH の関与に疑問を投げかけるものである。世界中で古くから人類になじみのある酢酸発酵のメカニズムを明らかにするために、今ここでアセトアルデヒドの酸化に関してきちんとした研究を行うべきであると考えた。

2. 研究の目的

アセトアルデヒドの酸化反応に関しては、ADH が触媒する反応からのアナロジーから想像されているにすぎない部分が多く、十分な科学的裏付けがないと言わざるをえない。エタノールの酸化反応が完全精製分子群によって生化学的に再構成が行われ、また遺伝学的にも ADH が酢酸発酵に不可欠な因子であることが複数の研究室から報告されてい

る。一方で、ALDH については生化学的にも遺伝学的にも裏付けがないに等しい。

私たちが行った、酢酸菌 *A. pasteurianus* SKU1108 株のドラフトゲノムには、既報の ALDH 遺伝子である *aldFGH* と相同性の高い、*aldFGH* に加えて、相同性が低いもののホモログとして考えられるもう一つの ALDH 遺伝子が存在することを確認している。ここでは両者を区別するために、後者を *aldSLC* 遺伝子と呼ぶ。

ALDH は、モリブドプテリンを補欠分子族とする脱水素酵素サブユニット、三つのヘム C を持ちユビキノロン還元を司るチトクロムサブユニット、鉄・硫黄クラスターを持つサブユニットから構成される。各サブユニット間の推定アミノ酸配列の同一性を調べると、AldH:AldL (脱水素サブユニット) 間で 30%、AldF:AldC (チトクロムサブユニット) 間で 34%、AldG:AldS (鉄・硫黄サブユニット) 間で 51%であった。

本研究は、酢酸発酵におけるアセトアルデヒド酸化を分子レベルで説明できるようにすることを目的とする。遺伝学的には、アセトアルデヒド酸化能を失った変異体を作成すること、ならびにその責任遺伝子を同定すること。生化学的には、アセトアルデヒド酸化を担う酵素の精製と再構成、つまり、アセトアルデヒドと酸素から酢酸を形成する試験管内再構成反応系の構築。この二点である。同時に、ALDH のタンパク質化学的、ならびに酵素化学的な解析も行う。

3. 研究の方法

本研究課題では、遺伝学的なアプローチと生化学的なアプローチで、*Acetobacter pasteurianus* SKU1108 株の ALDH の解析を行った。

(1) 遺伝学的解析

遺伝子破壊株 4 株 ($\Delta aldH$, $\Delta adhAB$, $\Delta adhAB \Delta aldSLC$, $\Delta adhAB \Delta aldFGH$) を、薬剤耐性マーカー遺伝子を残さない方法で作製した。これら破壊遺伝子を発現させるプラスミド 4 種 (*aldH*, *adhAB*, *aldSLC*, *aldFGH*) を作製した。遺伝子破壊株と遺伝子相補株を用いた生育実験、酢酸発酵実験を行った。また、AldFGH のみを過剰発現する菌株と AldSLC のみを過剰発現する菌株を得るために、 $\Delta adhAB \Delta aldSLC/aldFGH^+$ 株と $\Delta adhAB \Delta aldFGH/aldSLC^+$ 株をそれぞれ作製した。

(2) 生化学的解析

それぞれの菌株を培養し、膜画分を調製した。膜画分の酵素活性を測定した。特に、生理学的な電子受容体であるユビキノンの類縁体を用いた酵素活性を測定した。膜画分の酵素活性測定を行うことで、AldFGH と AldSLC の特徴を明らかにした。AldFGH と AldSLC の精製を試みた。それぞれ、1% デシルマルトシド (DM) で膜画分から可溶化し、

SP-Sepharose, ヒドロキシルアパタイト, Q-Sepharose, を組み合わせたカラムクロマトグラフィーを行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝学的解析

① カノニカル ALDH (*aldFGH*) の役割

酢酸菌 *A. pasteurianus* SKU1108 を用い、逆遺伝学的解析を行った。既報の ALDH 遺伝子である *aldFGH* と相同性の高い、*aldFGH* の中でも最も重要な役割であるサブユニットをコードする、*aldH* 遺伝子の破壊を行った。同時に、この遺伝子破壊株のための相補プラスミドを作製した。この遺伝子破壊株、相補株、ならびに野生株を用いて酢酸発酵試験と酵素活性測定を行った。*aldH* 破壊株 (Δ *aldH* 株) はエタノールを含む培地での生育が著しく抑制され、酢酸発酵をほとんど行うことができなかつた (図 1)。次に、 Δ *aldH* 株を、*aldH* 遺伝子を持つプラスミドで形質転換し相補株を作製した。この相補株を用いて酢酸発酵試験を行ったところ、酢酸発酵能が回復した。これらの実験結果から、*aldH* 遺伝子が酢酸発酵に必須であることが明らかとなった。

野生株、 Δ *aldH* 株、相補株をそれぞれエタノール培地で培養したときの、培地中のアセトアルデヒドを定量した。 Δ *aldH* 株は、野生株と比べて顕著にアセトアルデヒドを蓄積した。相補株では蓄積量は野生株並みに減少した。以上のことから、 Δ *aldH* 株はアセトアルデヒドの酸化が弱くなることによってアセトアルデヒドが蓄積し、その毒性のために生育が抑制されたと考えられる。

膜画分のアセトアルデヒド酸化活性を測定したところ、 Δ *aldH* 株は野生株の半分程度の活性を持っていた。本菌野生株が複数の ALDH (遺伝子) を持っていることが示唆された。つまり、*aldFGH* は酢酸発酵に大きく貢献しており、もう一つの ALDH は活性こそあるが、何らかの理由で酢酸発酵への貢献度が低いことが考えられた。 Δ *aldH* 株に残っている ALDH 活性は、本菌のドラフトゲノム上に見いだされたもう一つの ALDH 遺伝子 *aldSLC* に由来すると期待される。*aldFGH* をカノニカル ALDH と呼び、*aldSLC* をパラログ ALDH と呼ぶ。

② パラログ ALDH (*aldSLC*) の機能

上述のように、パラログ ALDH は活性を持つかも知れないが、酢酸発酵における役割は小さいように思われた。そこで、 Δ *aldH* 株を、パラログ ALDH 遺伝子 (*aldSLC*) を持つプラスミドで形質転換し、 Δ *aldH* 株での *aldSLC* 過剰発現を試みた。不十分なながらもアセトアルデヒド量の減少や酸度 (酢酸生成) の上昇が観察されたが、生育は依然として悪く、野生株と比較すると酢酸発酵可能であるとは言いがたい結果となった。つまり、パラログ ALDH を過剰に作らせても、それだけでは本菌の酢酸発酵を支えることはできないと結論づけ

た。

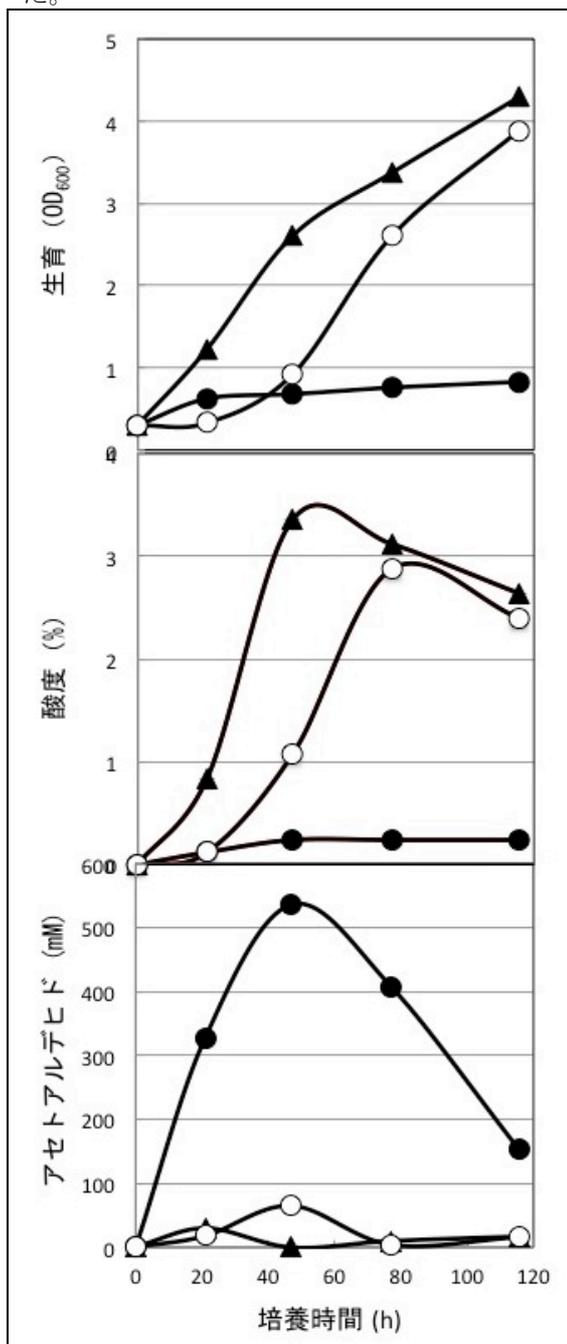


図 1. Δ *aldH* 株は酢酸発酵できない

野生株 (黒三角), Δ *aldH* 株 (黒丸), 相補株 (白丸) を、エタノールを含む培地で培養した。培養液の OD₆₀₀ (上), 酸度 (中), アセトアルデヒド (下) を測定した。

(2) 生化学的解析

① 菌株作製

野生株では両酵素が混在すると考えられたため、それぞれの ALDH 遺伝子を片方ずつ破壊し、それぞれ片方の ALDH のみを持つ菌株を作製した。ここでは同時に、酵素精製を目指すため、主要な膜タンパク質かつ主要なチトクロム成分である膜結合型アルコール脱水素酵素遺伝子 (*adhAB* 遺伝子) も破壊した。すなわち、 Δ *adhAB* Δ *aldSLC* (*AldFGH* のみを発現) ならびに Δ *adhAB* Δ *aldFGH* (*AldSLC*

のみを発現)を作製した。さらに、それぞれの ALDH 遺伝子を搭載したプラスミドを構築した。よって、 $\Delta adhAB \Delta aldSLC/aldFGH^{++}$ (AldFGH のみを高発現)ならびに $\Delta adhAB \Delta aldFGH/aldSLC^{++}$ (AldSLC のみを高発現)を作製した。各菌株の膜画分のアセトアルデヒド：フェリシアニド酸化還元活性とアセトアルデヒド：ユビキノーン-1 酸化還元活性を測定した (図 2)。 $\Delta adhAB \Delta aldFGH$ 株が ALDH 活性を持ち、また *aldSLC* を搭載したプラスミドによって ALDH 活性が著しく上昇したので、今回見いだした新規 ALDH 遺伝子 *aldSLC* の産物が確かに ALDH 活性を持つことが示された。各菌株の ALDH 活性の数値から、野生株の ALDH 活性は約 2 割の AldFGH と約 8 割の AldSLC から構成されていると考察した。プラスミドによる過剰発現はそれぞれ約 4 倍の活性上昇をもたらした。両者ともフェリシアニド還元活性とユビキノーン-1 還元活性は 4 : 1 程度の違いがあった。また、膜画分の SDS-PAGE、ヘム染色から、プラスミドによって各チトクロムサブユニットが高発現していることがわかった。

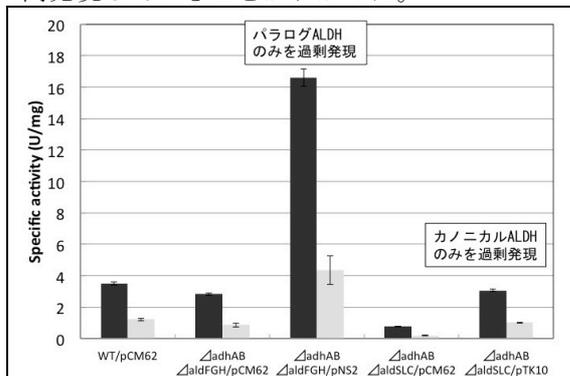


図 2. AldFGH のみを高発現ならびに AldSLC のみを高発現する菌株の ALDH 活性

左から、空ベクターを持つ野生株、空ベクターを持つ $\Delta adhAB \Delta aldFGH$ 株、 $\Delta adhAB \Delta aldFGH/aldSLC^{++}$ 株、空ベクターを持つ $\Delta adhAB \Delta aldSLC/aldFGH$ 株、 $\Delta adhAB \Delta aldSLC/aldFGH^{++}$ 株。それぞれの膜画分を調製し、フェリシアニド還元活性 (濃灰色) とユビキノーン-1 還元活性 (薄灰色) を測定した。

② 二つの ALDH の特徴

$\Delta adhAB \Delta aldSLC$ 株ならびに $\Delta adhAB \Delta aldFGH$ 株の膜画分を用いて、AldFGH ならびに AldSLC の解析を行った。至適 pH は、フェリシアニド還元活性とユビキノーン-1 還元活性いずれも AldFGH が pH 4.0, AldSLC が pH 5.0 であった。アセトアルデヒドに対する K_M 値は、AldFGH が 0.34 mM, AldSLC が 3.6 mM であった。よって、AldFGH は比較的酸性側で、基質に高親和性で働く酵素であるのに対し、AldSLC は比較的中性側で、基質に低親和性で働く酵素であると結論づけた。

③ ALDH の精製

上述した AldFGH のみを高発現する株なら

びに AldSLC のみを高発現する株から ALDH の精製を試みた。ALDH の精製には、フェリシアニドと、より生理学的であると考えられるユビキノーン-1 を人工電子受容体として活性を追跡した。界面活性剤ドデシルマルトシド (DM) で膜から可溶化し、SP-Sepharose, ヒドロキシルアパタイト, Q-Sepharose を組み合わせたカラムクロマトグラフィーで精製を試みた。

収率は悪いものの、この方法で AldSLC はほぼ純化することができた。最も小さいサブユニットである AldS については N 末端アミノ酸配列を解析し、分子の同定を行った。一方、AldFGH の方は、概ね純化された様子であったが、まだ不十分と言わざるをえない。しかも、各カラムクロマトグラフィーにおいて、フェリシアニド還元活性とユビキノーン-1 還元活性のピークが一致しなかった。この結果は、AldFGH 複合体が部分的に解体しており、健全な複合体と解体したサブユニットがクロマトグラフィーカラムから溶出されたものと理解している。複合体がサブユニットへ解体しないような条件を検討する必要がある。

以上をまとめると、本研究ではカノニカルな膜結合型 ALDH が発酵生理学的において必須因子であることを示した。一方のパラログ ALDH は活性こそ高いが、酢酸発酵への貢献度は低いことを示した。至適 pH やアセトアルデヒドに対する親和性という観点でも二つの酵素は特徴を持っていた。AldSLC は複合体として精製することができたが、AldFGH は不安定で解体しているのではないと考えられた。

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 8 件)

① Nishikura-Imamura S, Matsutani, M, Insomphun C, Vangnai A.S, Toyama H, Yakushi T, Abe T, Adachi O, Matsushita K. (2014) Overexpression of a type II 3-dehydroquinate dehydratase enhances the biotransformation of quinate to 3-dehydroshikimate in *Gluconobacter oxydans*. Appl Microbiol Biotechnol 査読有 98: 2955-2963.

② Kawai S, Yakushi T, Matsushita K, Kitazumi Y, Shirai O, Kano K. (2014) The electron transfer pathway in direct electrochemical communication of fructose dehydrogenase with electrodes. Electrochemistry Communications 査読有 38: 28-31.

③ Miura H, Mogi T, Ano Y, Migita C.T, Matsutani M, Yakushi T, Kita K, Matsushita K. (2013) Cyanide-insensitive quinol oxidase (CIO) from *Gluconobacter oxydans* is a unique terminal oxidase subfamily of cytochrome *bd*. J Biochem 査読有 153: 535-545.

④Matsutani M, Kawajiri E, Yakushi T, Adachi O, Matsushita K. (2013) Draft Genome Sequence of Dihydroxyacetone-Producing *Gluconobacter thailandicus* Strain NBRC 3255. Genome Announc 査読無 1: e0011813.

⑤Sato S, Morita N, Kitamoto D, Yakushi T, Matsushita K, Habe H. (2013) Change in product selectivity during the production of glyceric acid from glycerol by *Gluconobacter* strains in the presence of methanol. AMB Express 査読有 3: 20.

⑥ Matsutani M, Nishikura M, Saichana N, Hatano T, Masud-Tippayasak U, Theeragool G, Yakushi T, Matsushita K. (2013) Adaptive mutation of *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 enhances acetic acid fermentation ability at high temperature. J Biotechnol 査読有 165: 109-119.

⑦Kawai S, Goda-Tsutsumi M, Yakushi T, Kano K, Matsushita K. (2013) Heterologous overexpression and characterization of a flavoprotein-cytochrome *c* complex fructose dehydrogenase of *Gluconobacter japonicus* NBRC3260. Appl Environ Microbiol 査読有 79: 1654-1660.

⑧ Matsutani M, Hirakawa H, Saichana N, Soemphol W, Yakushi T, Matsushita K. (2012) Genome-wide phylogenetic analysis of differences in thermotolerance among closely related *Acetobacter pasteurianus* strains. Microbiology 査読有 158: 229-239.

[学会発表] (計7件)

①新納俊, 児玉知大, 松谷峰之介, 片岡尚也, 薬師寿治, 松下一信 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108の2つの膜結合型アルデヒド脱水素酵素の精製および特徴付け, 日本生化学会中国四国支部例会, 2014年6月6日~7日, 愛媛大学(松山市)

②新納俊, 児玉知大, 薬師寿治, Theeragool Gunjana, 松下一信 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 アルデヒド脱水素酵素のパラログセット *aldSLC* は酢酸発酵を保証できない, 日本生物工学会, 2013年9月18日~20日, 広島国際会議場(広島市)

③児玉智大, 薬師寿治, 松谷峰之介, ティーラゲール・ガンジャナ, 松下一信 酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 が行う酢酸発酵における膜結合型アルデヒド脱水素酵素の役割, 日本農芸化学会, 2013年3月25日~27日, 東北大学(仙台市)

④Yakushi T, Mukai H, Kodama T, Matsutani M, Theeragool G, Matsushita K. Tales of two enzymes: membrane-bound alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase of acetic acid bacteria. The 3rd International Conference on Acetic Acid Bacteria -Vinegar and other products, Cordoba (Spain), 2012年4月17日~20日

⑤児玉智大, 薬師寿治, 松谷峰之介, ティーラゲール・ガンジャナ, 松下一信 酢酸菌

Acetobacter pasteurianus SKU1108の膜結合型アルデヒド脱水素酵素が酢酸発酵に關与する遺伝学的証拠, 日本農芸化学会2012年度大会, 2012年3月24日, 京都女子大学(京都)

⑥ Kodama T, Matsutani M, Yakushi T, Theeragool G, Matsushita K. Reverse genetics for membrane-bound aldehyde dehydrogenase of *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月6日, 札幌コンベンションセンター(札幌)

⑦ Yakushi T, Kodama T, Matsutani M, Theeragool G, Matsushita K. Evidence for the involvement of a molybdocofactor-dependent aldehyde dehydrogenase in the acetic acid fermentation of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, 2011年8月29日, Kosa Hotel (コンケン, タイ国)

[図書] (計1件)

①松下一信, 薬師寿治 (分担執筆) 朝倉書店(2012) 酢の機能と科学(食物と健康の科学シリーズ) 15ページ(pp.136-150)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 酢酸生産能が向上した酢酸菌の育種方法

発明者: 松下一信, 秦野智行, 薬師寿治, 松谷峰之介, ナツアラン・サイチャナ, 西倉慎顕, ティーラゲール・ガンジャナ

権利者: 国立大学法人山口大学

種類: 特許

番号: 特願2012-210068

出願年月日: 2012年9月24日

国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

名称: 高温酢酸発酵酢酸菌

発明者: 松下一信, 薬師寿治, 足立収生, ティーラゲール・ガンジャナ, 秦野智行

権利者: 国立大学法人山口大学

種類: 特許

番号: 特許第5470807号

取得年月日: 2014年2月14日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

山口大学農学部応用微生物学研究室

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

薬師 寿治 (Toshiharu Yakushi)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30324388

(2)研究分担者

松下 一信 (Kazunobu Matsushita)

山口大学・農学部・教授 (特命)

研究者番号：50107736

(3)連携研究者

なし