

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658070

研究課題名（和文） エネルギー代謝制御による酢酸菌酸化発酵機能の有効利用に関する研究

研究課題名（英文） Effective utilization of oxidative fermentation mechanism of acetic acid bacteria by engineering of energy metabolism

研究代表者

新井 博之 (ARAI HIROYUKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70291052

研究成果の概要（和文）：酢酸菌はアルコールや糖を不完全酸化により有機酸に変換する能力があり、食酢醸造等に利用されてきた。*Acetobacter* 属酢酸菌の野生株および食酢醸造株のトランスクリプトーム解析を行った結果、エタノールの存在時に TCA 回路関連の遺伝子発現が顕著に抑制されることが明らかになり、これにより菌体外に酢酸が蓄積されやすくなることが示された。比較ゲノム解析により、食酢醸造株ではグリオキシル酸経路遺伝子が欠失していることが分かった。野生株の同遺伝子破壊株を作製し解析したところ、グリオキシル酸経路の欠失はエタノールから生産された酢酸の過酸化を遅らせ、食酢醸造に有利であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Acetic acid bacteria have the distinctive ability to produce organic acids by the incomplete oxidization of various alcohols and sugars. Transcriptome analysis of the wild type and the strain utilized for vinegar production under various growth conditions revealed that ethanol significantly represses the genes for the TCA cycle enzymes and that might cause the temporal accumulation of acetate. Comparative genome analysis have shown that the genes for the glyoxylate pathway are missing in the strains utilized for vinegar production. Deletion of those genes in the wild-type strain caused delay of acetate consumption, indicating that the loss of the glyoxylate pathway is beneficial for vinegar production.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：酢酸菌、酸化発酵、不完全酸化、*Acetobacter*

1. 研究開始当初の背景

酢酸菌は α プロテオバクテリアに属する絶対好気性細菌であり、アルコールや糖を二酸化炭素にまで完全に酸化せず、不完全酸化により有機酸として蓄積する性質を持つ。この反応は酸化発酵と呼ばれ、食酢醸造に古くから利用されてきた。また、酢酸菌はアルコール飲料の酸敗の原因ともなり、産業上重要な微生物とされている。不完全酸化反応はピロキノリンキノン(PQQ)を補酵素とする膜

結合型のデヒドロゲナーゼによって触媒されている。この酵素は基質特異性が低いため、近年では酢酸菌を生体触媒としてビタミン C や抗糖尿病薬の前駆体生産に利用されるなど、バイオプロセスへの応用が期待されている。すでに数株の酢酸菌については国内外で全ゲノムがも解読されており、不完全酸化に関わるアルコール脱水素酵素や呼吸酵素に関する研究が進められてきた。しかし、遺伝子の発現制御機構などに関する分子生物

学的研究や、トランスクリプトーム、メタボロームなどの網羅的な研究については、他の産業利用株に比べると遅れている面があった。

2. 研究の目的

本研究では、代表的な酢酸菌である *Acetobacter* 属細菌のうち、野生株である *Acetobacter aceti* NBRC14818、および、食酢醸造に利用されてきた *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 を材料とし、特にエネルギー代謝系と中央炭素代謝経路を中心とした比較ゲノム解析と、各種炭素源や培養条件でのトランスクリプトーム解析を行い、そのグローバルな制御機構についての知見を得る。それらの知見から、酢酸菌がエタノールの不完全酸化により酢酸を生産するメカニズムの分子遺伝学的理解と、酢酸生産性に寄与する代謝系の特定と役割の解析を行い、エネルギー代謝工学的な視点からの酢酸菌の有効な活用法を探ることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) *Acetobacter* 属細菌の比較ゲノム解析とトランスクリプトーム解析

野生株 *Acetobacter aceti* NBRC14818、および、食酢醸造株 *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 の間で、TCA 回路、グリオキシル酸経路、ピルビン酸代謝系、呼吸鎖コンポーネントなどの遺伝子構成に違いが見られており、これらの遺伝子構成の違いや、発現パターンの違いが、不完全酸化（酢酸蓄積性）などに影響を及ぼしていると予想される。*A. aceti* と *A. pasteurianus* について、各種炭素源の違いや、増殖フェーズや pH などの培養条件の違いによるトランスクリプトーム変化について、Roche-NimbleGen のマイクロアレイを用いて解析し、主に中央炭素代謝とエネルギー代謝に関して、どの遺伝子がどの条件で発現しているかを調べ、代謝制御の全容について理解する。

(2) 中央代謝経路の解析

菌株間で構成に違いが見られた TCA 回路、グリオキシル酸経路、ピルビン酸代謝系の遺伝子について、トランスクリプトーム解析で発現が確認されたものについては、変異株を作製したり、プラスミドで遺伝子を導入したりして、生育や酢酸生産性の変化を解析し、その役割を調べる。

(3) エネルギー代謝制御・呼吸酵素の解析

A. aceti NBRC14818 は好気呼吸鎖の末端酸化酵素であるキノールオキシダーゼを 4 種類持っており、培養条件により使い分けられていると予想される。キノールオキシダーゼ

は、酢酸生産時に膜結合型デヒドロゲナーゼによるエタノール酸化により生じる電子を、キノンを介して酸素に伝達することでエネルギー生産に関与しているため、その使い分けが不完全酸化と完全酸化の制御と密接に関係していると考えられる。そこで、各末端酸化酵素の大腸菌での異種発現を試み、各酵素の性質（酸素アフィニティー、プロトン排出効率等）を解析する。また、トランスクリプトーム解析から得られる発現制御の結果と、各酵素の性質との対応から、酢酸菌におけるエネルギー代謝と炭素代謝の制御メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 比較ゲノム解析とトランスクリプトーム解析

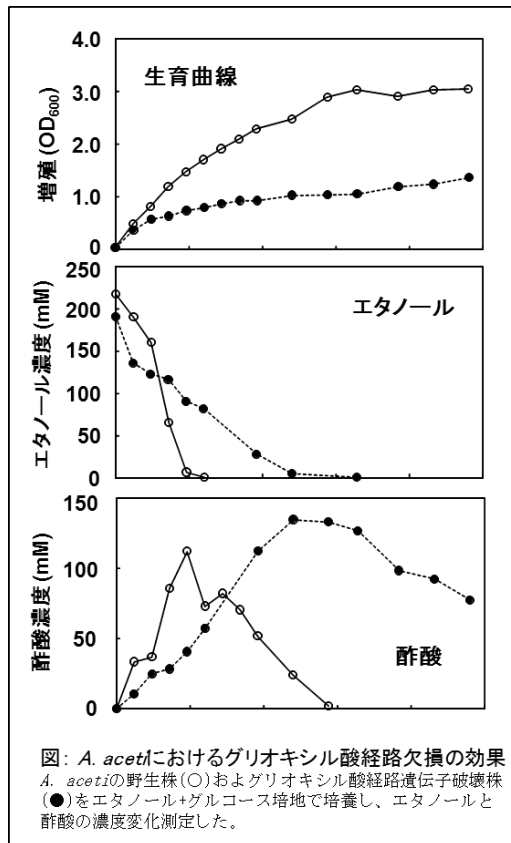
酢酸菌の野生株 *Acetobacter aceti* NBRC14818 と、食酢醸造株である *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 について、各種炭素源（グルコース、エタノール、酢酸、グルコース+エタノール）、pH、培養条件（振盪、静置）の違いによるトランスクリプトームの違い、および、エタノール酸化過程の生育フェーズによるトランスクリプトームの経時的変化について、DNA マイクロアレイ（Roche-NimbleGen のカスタムアレイ）を用いて解析した。

両菌株に共通した現象として、エタノールの存在により TCA 回路関連酵素の遺伝子発現が顕著に抑制されることが明らかとなった。これは、エタノールから酢酸への不完全酸化により生じる電子を用いた酸化的リン酸化により ATP 生産が十分に行われる条件では、炭素源の異化代謝を抑えるようなメカニズムが働いているためと考えられた。また、解糖系酵素の遺伝子については、生育条件によって大きく発現変化しないことから、エタノールとグルコースが共存する酢酸生産条件では、解糖系からのオーバーフローメタボリズムにより細胞内にピルビン酸やアセチル CoA が余剰となることで、エタノールから細胞外に生成した酢酸の消費が抑えられることが示唆され、このことが酢酸菌がエタノールを不完全酸化して酢酸を一時的に蓄積する大きな要因の 1 つと考えられた。また、エタノールとグルコースが共存する条件では、ストレス応答関係の遺伝子発現が誘導されていた。これは、余剰なピルビン酸やアセチル CoA から、毒性のアセトアルデヒドが生産されることが原因と予想された。

また、*A. aceti* にのみ存在するグリオキシル酸経路の遺伝子は、エタノール、および、酢酸の資化時にのみ強く発現誘導されており、この経路が酢酸代謝に重要であることが示された。

(2) グリオキシル酸経路の役割の解析

*A. aceti*ではグリオキシル酸経路が酢酸代謝に重要な役割を果たすことがトランスクリプトーム解析により示唆されたが、酢酸蓄積性の高い食酢醸造株である *A. pasteurianus* ではこの経路の遺伝子が欠損していた。グリオキシル酸経路は中央炭素代謝経路の一つであり、エタノールや酢酸など、アセチル CoA を経由して TCA 回路で代謝される化合物を唯一の炭素源として生育する際に、TCA 回路のバイパス経路としてオキサロ酢酸を補充するために必要とされる。このため、グリオキシル酸経路の有無は酢酸菌の酢酸消費活性に影響をおよぼしていると予想された。そこで、*A. aceti*のグリオキシル酸経路遺伝子破壊株を作製し、野生株と酢酸の蓄積性を比較した。その結果、グリオキシル酸経路の欠失は、エタノールとグルコースが共存する条件下でエタノールから生産された酢酸の過酸化を遅らせ、食酢醸造に有利であることが示された(図)。



(3) 呼吸酵素の解析

A. aceti NBRC14818 のゲノムには、好気呼吸において酸素を水に還元する末端酸化酵素であるキノールオキシダーゼの遺伝子が4種類存在する。マイクロアレイの結果から、4種のキノール酸化酵素遺伝子の発現パターンに違いが見られ、生育条件に応じた使い分けがあることが明らかになった。

4種の末端酸化酵素について酵素学的な性質の解析を行うために、その遺伝子を大腸菌の呼吸酵素欠損株に導入して異種発現を試みた。しかし、いずれの遺伝子を用いても大腸菌の呼吸欠損を相補することはできなかった。この原因として、酢酸菌の末端酸化酵素の成熟化に必要な因子が大腸菌では欠如しているか、大腸菌の呼吸鎖との電子授受がうまくいかない可能性が考えられた。

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2件)

(1) Kenta Sakurai, Shoko Yamazaki, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi, and Hiroiyuki Arai, Role of the glyoxylate pathway in acetic acid production by *Acetobacter aceti*, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, vol.115, No. 1, pp.32-36 (2013) doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.07.017.

(2) Kenta Sakurai, Hiroiyuki Arai, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi, Changes in the gene expression profile of *Acetobacter aceti* during growth on ethanol, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, vol.113, No. 3, pp. 343-348 (2012) doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.11.005.

[学会発表] (計5件)

(1) 菅原 圭悟、桜井 健太、橋口 和典、長野 正信、新井 博之、石井 正治、五十嵐 泰夫、伝統的な壺作り純米黒酢醸造における酢酸菌の多様性の解析、日本農芸化学会大会、2013. 3. 26、東北大学(仙台)

(2) 新井 博之、山崎 翔子、桜井 健太、石井 正治、五十嵐 泰夫、*Acetobacter aceti*のグリオキシル酸経路欠損による酢酸生産性の変化、日本生物工学会大会、2012. 10. 25、神戸国際会議場(神戸)

(3) 山崎 翔子、桜井 健太、新井 博之、石井 正治、五十嵐 泰夫、グリオキシル酸経路が *Acetobacter aceti* の酢酸代謝に与える影響、日本農芸化学会大会、2012. 3. 23、京都女子大学(京都)

(4) 桜井 健太、新井 博之、石井 正治、五十嵐 泰夫、酢酸菌におけるピルビン酸代謝系の遺伝子構成と発現制御、日本農芸化学会大会、2012. 3. 23、京都女子大学(京都)

(5) 桜井 健太、新井 博之、石井 正治、五十嵐 泰夫、Transcriptome profiling of

Acetobacter aceti grown on different carbon sources、国際微生物学会 (IUMS2011)、2011.9.6、札幌コンベンションセンター (札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 博之 (ARAI HIROYUKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70291052

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：