

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450095

研究課題名(和文) 還元的モノづくりを指向する酢酸菌の遺伝子工学：細胞内ニコチンアミド系補酵素の制御

研究課題名(英文) Genetic engineering on increasing NADPH supply for reductive biotransformation by acetic acid bacteria.

研究代表者

薬師 寿治 (Yakushi, Toshiharu)

山口大学・創成科学研究科・准教授

研究者番号：30324388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：グルコノバクター属酢酸菌は膜結合型グルコース脱水素酵素(GdhM)を用いて、グルコースを主に細胞外で代謝し、一部しか細胞内で代謝しない。一方、本菌の細胞内グルコース代謝はNADPHを生じる代謝である。本研究では、細胞内グルコース代謝ならびにNADPHレベルを向上させることを目的にGdhMを欠損させた。さらに、NADPHを補酵素として必要とするシキミ酸生産で、NADPH供給を評価することを試みた。GdhMの遺伝子破壊株は親株と比べて、グルコースの細胞内利用が活発であった。各種酵素活性測定の結果からもgdhM遺伝子破壊株の細胞内でNADPH供給が増大したことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gluconobacter sp., acetic acid bacterium, oxidizes glucose on the outer surface of the cytoplasmic membrane with membrane-bound glucose dehydrogenase (GdhM) and accumulates gluconic acid and its derivatives. Thus, only limited parts of glucose are transported into the cytoplasm and metabolized. Because glucose metabolism in the cytoplasm mostly depends on pentose phosphate pathway, it is reasonably assumed that G. oxydans likely produces much NADPH, if high amounts of glucose are metabolized in the cytoplasm. This study aimed to increase NADPH supply from glucose by inactivating GdhM. This study tried to couple NADPH produced in the gdhM cells and the reduction reaction producing shikimate from dehydroshikimate. When cultivated on glucose, biomass yield and amounts of an end metabolite in the gdhM strain were elevated. Taken together with enzyme activity measurements, some changes on glucose metabolism in the gdhM cells suggested increases in the NADPH level.

研究分野：生化学

キーワード：酢酸菌 発酵 応用微生物 酵素 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

酢酸菌はエタノールからの酢酸発酵，ソルビトールからのソルボース発酵，グルコースからのグルコン酸あるいはケトグルコン酸発酵など，そのユニークな酸化物質変換能が利用されてきた。酢酸菌はこれら酸化的な生産物を，一時的あるいは長時間にわたって培地中に蓄積させたまま，さらなる代謝をしない。申請者らは，この風変わりな代謝系を「酸化発酵」と呼び，酵母が行うアルコール発酵に代表される「よく知られた発酵」とは異なる能力として解析してきた。

酢酸菌の一つである *Gluconobacter oxydans* 621H は，2005 年にゲノム情報が公開され，酢酸菌研究のポストゲノム時代を迎えた。ゲノム情報は，古くから指摘されていたように，いわゆる解糖系 (Embden-Meyerhof-Parnas 経路：EMP 経路) のホスホフルクトキナーゼ遺伝子を欠くが，ペントースリン酸経路 (PP 経路) ならびに Entner-Doudoroff 経路 (ED 経路) を完全な状態で持っていることを示した。さらに，TCA 回路は 2 つの酵素を欠き，グリオキシル酸経路も不完全である。さらに逆遺伝学的解析から，*G. oxydans* の PP 経路酵素の遺伝子を破壊すると，著しい生育抑制が見られることから，PP 経路を主な解糖系としていることが推測される。これらのことから，本菌におけるニコチンアミド系補酵素 (NADP(H) と NAD(H)) 代謝は，他の微生物と比較すると NADP(H) に傾いていることが考えられる。エネルギー代謝については，その呼吸鎖にプロトンポンプ能のない Type-II NADH 脱水素酵素 (NDH-II) のみを持つ。事実，NADH 酸化活性を持つ一方で，NADPH の酸化能は検出限界程度しか持っていないことを観察している。しかしながら，細胞内の NADP(H) と NAD(H) レベルを測定したところ，NAD(H) の方が NADP(H) よりも多く，両者とも酸化型としての存在比が高かった。

また，私たちは酢酸菌の酵素を利用して，キナ酸を出発物質とし，デヒドロキナ酸，デヒドロシキミ酸を介したシキミ酸生産系を開発してきた。一方，生細胞を用いた生産系の構築を試みているが，現在までに，デヒドロシキミ酸までの定量的な生産系の構築は完了している。さらに NADPH を用いた還元的なシキミ酸生産が残された課題となっている。

2. 研究の目的

Gluconobacter 属酢酸菌は，これまで膜結合型酸化酵素による糖や糖アルコールの酸化的物質変換に利用されてきた。本研究では，本菌の糖代謝が NADPH を生みやすく，かつ TCA サイクルが不完全であるがゆえに NADH が生じにくいという特徴に基づいて，本菌を，NADPH を利用した還元的モノづくりを利用することを試みた。還元力供給源としてグルコースを考えた。野生株では，グル

コースのほとんどが膜結合型グルコース脱水素酵素 (GdhM) によってグルコン酸へと酸化されるため，まず，この遺伝子の破壊株を作製し，その代謝挙動を解析した。

次に，キナ酸を初発原料として酸化，脱水，還元によってシキミ酸を生産する経路に着目した。この最終段階であるデヒドロシキミ酸の還元が NADPH 依存であることを利用し，シキミ酸の生産性の変化で，NADPH 供給量の変化と見なすことを計画した。

3. 研究の方法

(1) 菌株構築

G. oxydans NBRC3293 株を親株に，膜結合型グルコース脱水素酵素遺伝子破壊株 (Δ gdhM 株) を，マーカー遺伝子を残さないやり方で，インフレーションの形で作製した。

(2) 遺伝子操作

近縁の *G. oxydans* NBRC3244 株のゲノムから，デヒドロキナ酸脱水素酵素 (DHQase) の遺伝子 (*aroQ*)，NADP⁺ 依存型グルコース脱水素酵素 (NADP⁺-GDH) の遺伝子 (*gdhS*)，NADP⁺ 依存型シキミ酸脱水素酵素 (SKDH) の遺伝子 (*aroE*) をクローニングした。これらを，*Gluconobacter* で使用できる pBBR1MCS-4 あるいは pCM62 にサブクローニングした。

(3) 酵素活性

DHQase 活性は，234 nm の吸光度を追跡することで測定した。NADP⁺ 依存のグルコース脱水素酵素，グルコース-6-リン酸脱水素酵素，アルデヒド脱水素酵素，シキミ酸脱水素酵素の活性は，それぞれ，グルコース，グルコース-6-リン酸，アセトアルデヒド，シキミ酸を基質とし，NADPH の増加を 340 nm の吸光度で追跡することによって測定した。NADH 酸化活性および NADPH 酸化活性はそれぞれの減少を 340 nm の吸光度で追跡することで測定した。いずれも酵素活性も，1 分間あたり 1 μ mol の基質を処理できる酵素量を 1 ユニットとした。

(4) 物質の定量

グルコース，酢酸，キナ酸，デヒドロキナ酸，デヒドロシキミ酸，シキミ酸は高速液体クロマトグラフィーによって定量した。

4. 研究成果

(1) Δ gdhM 株のグルコース代謝

Δ gdhM 株と親株をグルコース培地で培養したところ， Δ gdhM 株は親株に比べ細胞収量が約 6 倍増加し，細胞内代謝産物である酢酸を約 7 倍多く蓄積した。両菌株共に培地中のグルコースを全て消費した (図 1)。親株は GdhM が健全であるため，ほとんどのグルコースは酢酸ではなくグルコン酸，あるいはさらに酸化されたケトグルコン酸や 2,5-ジケトグルコン酸に変換したと考えられる。GdhM が機能できなくなることによってグルコースの細胞内での利用が活発になったことが示唆された。

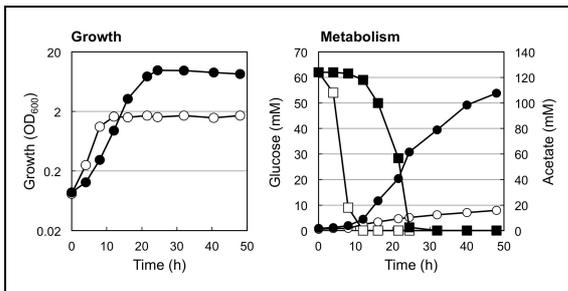


図 1. $\Delta gdhM$ 株のグルコース培地での培養
 $\Delta gdhM$ 株と親株をグルコース培地、ジャーファーマンターで培養した。前培養はグリセロール培地で行った。本培養の pH は KOH で 6.5 に維持した。左：生育（白丸：野生株，黒丸： $\Delta gdhM$ 株），右：培養液中のグルコースと酢酸の濃度（白四角：野生株のグルコース，黒四角： $\Delta gdhM$ 株のグルコース，白丸：野生株の酢酸，黒丸： $\Delta gdhM$ 株の酢酸）。

(2) NADP⁺依存型脱水素酵素活性

本菌の糖代謝に関わる酵素活性の測定を行った。活性が強いと指摘されていた NADP⁺依存のグルコース脱水素酵素 (NADP⁺-GDH)、PP 経路のグルコース-6-リン酸脱水素酵素、ピルビン酸からの主要な代謝に関わる NADP⁺依存アルデヒド脱水素酵素 (NADP⁺-ALDH)、この 3 つの活性を測定した (図 2)。 $\Delta gdhM$ 株は親株に比べ、グルコース脱水素酵素活性は約 2 倍低く、グルコース-6-リン酸脱水素酵素はほとんど差がなく、アルデヒド脱水素酵素活性は約 2 倍高かった。 $\Delta gdhM$ 株では、グルコースの細胞内への取り込みが上昇することが推測されるが、その代謝流量を制限するために NADP⁺-GDH 活性を低下させたと考察した。一方、代謝流量の増加で危惧されるアセトアルデヒドレベルの上昇を回避するために、NADP⁺-ALDH 活性を向上させたと考察した。

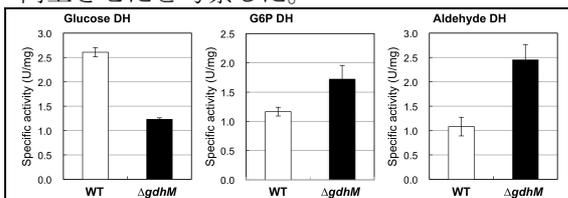


図 2. $\Delta gdhM$ 株における NADP⁺依存型脱水素酵素活性

$\Delta gdhM$ 株と親株をグルコース培地、ジャーファーマンターで、図 1 と同様に培養した。細胞から可溶性画分を調製し、NADP⁺依存のグルコース脱水素酵素 (左)、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (中央)、アルデヒド脱水素酵素 (右) 活性を測定した。白：野生株，黒： $\Delta gdhM$ 株。

(3) 膜画分の NADH 酸化活性と NADPH 酸化活性

これまでの結果から、 $\Delta gdhM$ 株では、NADPH レベルの上昇が推測できる。NADPH レベルの恒常性を維持するため、 $\Delta gdhM$ 株では、NADPH 酸化活性の上昇が考えられた。

そこで、膜画分の NADH の酸化活性と NADPH の酸化活性を測定した。この活性は呼吸鎖に繋がったものであると想定している。グリセロール培地で培養した場合は両株間に違いはほとんど見られなかったが、グルコース培地で培養した場合、 $\Delta gdhM$ 株は親株に比べ、NADPH 酸化活性が倍増していた。NADH 酸化活性もやや増加していたが大きな違いはなかった。よって $\Delta gdhM$ 株では、グルコース代謝において NADPH 酸化の必要性が高まったことが示唆された。

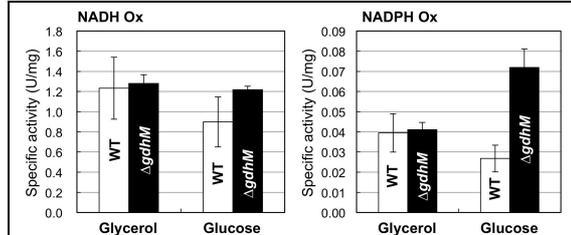


図 3. $\Delta gdhM$ 株における NADH 酸化活性と NADPH 酸化活性

$\Delta gdhM$ 株と親株をグリセロール培地 (Glycerol) とグルコース培地 (Glucose) で培養した。細胞から膜画分を調製し、NADH (左) あるいは NADPH (右) の現象を追跡し、それぞれの酸化活性を測定した。左右のグラフの縦軸は 20 倍の違いがあることに注意。白：野生株，黒： $\Delta gdhM$ 株。

(4) シキミ酸生産に関わる酵素の高発現

本菌を用いたキナ酸からのシキミ酸生産において重要であると考えられるデヒドロキナ酸脱水素酵素 (DHQase) と NADP⁺依存型シキミ酸脱水素酵素 (SKDH)、ならびに NADPH 再生として用いる NADP⁺依存型グルコース脱水素酵素 (NADP⁺-GDH) を同時に高発現する株の構築を試みた。DHQase のみ、あるいは SKDH のみの高発現にとどまり、DHQase と SKDH の同時高発現を行うことができなかった。DHQase 及び SKDH の単独での高発現はできているため、同時に高発現させることが困難であると示唆された。

(5) まとめ

本研究では、酸化的物質変換を得意とする酢酸菌を、NADPH 依存の還元的モノづくりを利用することを狙った。グルコースを還元力供給とするため、グルコースを酸化する GdhM の機能欠損を行った。このことによって、細胞内代謝の最終産物である酢酸の生産量が増大した。不完全酸化代謝産物であるグルコン酸とケトグルコン酸の生産量がほとんどなくなったと考えられる。細胞内代謝の改変は、NADP⁺依存性脱水素酵素活性の変動からも示唆された。さらに膜の NADPH 酸化能が上昇した。

このように、GdhM の機能欠損によって、グルコースからの NADPH 供給量の増大が示唆されたが、還元的モノづくりとして実施したシキミ酸生産実験が想定以上に難航した。この問題を克服し、GdhM の有無によるシキ

ミ酸生産性の比較を行う予定である。

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 10 件)

①Ano, Y., Hours, R. A., Akakabe, Y., Kataoka, N., Yakushi, T., Matsushita, K. and Adachi, O. (2017): Membrane-bound glycerol dehydrogenase catalyzes oxidation of D-pentonates to 4-keto-D-pentonates, D-fructose to 5-keto-D-fructose, and D-psicose to 5-keto-D-psicose. *Biosci Biotechnol Biochem* 81: 411-418. 査読有

②Sainz, F., Jesus Torija, M., Matsutani, M., Kataoka, N., Yakushi, T., Matsushita, K. and Mas, A. (2016): Determination of dehydrogenase activities involved in D-glucose oxidation in *Gluconobacter* and *Acetobacter* strains. *Front Microbiol* 7: 1358. 査読有

③Matsutani, M., Hirakawa, H., Hiraoka, E., Theeragool, G., Yakushi, T. and Matsushita, K. (2016): Complete genome sequencing and comparative genomic analysis of the thermotolerant acetic acid bacterium, *Acetobacter pasteurianus* SKU1108, provide a new insight into thermotolerance. *Microbes Environ* 31: 395-400. 査読有

④ Matsushita, K., Azuma, Y., Kosaka, T., Yakushi, T., Hoshida, H., Akada, R. and Yamada, M. (2016): Genomic analyses of thermotolerant microorganisms used for high-temperature fermentations. *Biosci Biotechnol Biochem* 80: 655-668.

⑤ Soemphol, W., Tatsuno, M., Okada, T., Matsutani, M., Kataoka, N., Yakushi, T. and Matsushita, K. (2015): A novel $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ antiporter plays an important role in the growth of *Acetobacter tropicalis* SKU1100 at high temperatures via regulation of cation and pH homeostasis. *J Biotechnol* 211: 46-55. 査読有

⑥Matsutani, M., Ito, K., Azuma, Y., Ogino, H., Shirai, M., Yakushi, T. and Matsushita, K. (2015): Adaptive mutation related to cellulose producibility in *Komagataeibacter medellinensis* (*Gluconacetobacter xylinus*) NBRC 3288. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 7229-7240. 査読有

⑦Kataoka, N., Matsutani, M., Yakushi, T. and Matsushita, K. (2015): Efficient production of 2,5-diketo-D-gluconate via heterologous expression of 2-ketogluconate dehydrogenase in *Gluconobacter japonicus*. *Appl Environ Microbiol* 81: 3552-3560. 査読有

⑧ Charoenyingcharoen, P., Matsutani, M., Yakushi, T., Theeragool, G., Yukphan, P. and Matsushita, K. (2015): A functionally critical single nucleotide polymorphism in the gene encoding the membrane-bound alcohol dehydrogenase found in ethanol

oxidation-deficient *Gluconobacter thailandicus*. *Gene* 567: 201-207. 査読有

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

⑩Matsutani, M., Fukushima, K., Kayama, C., Arimitsu, M., Hirakawa, H., Toyama, H., Adachi, O., Yakushi, T. and Matsushita, K. (2014): Replacement of a terminal cytochrome *c* oxidase by ubiquinol oxidase during the evolution of acetic acid bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1837: 1810-1820. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

① 平田花織, 松谷峰之介, 足立収生, 片岡尚也, 薬師寿治, 松下一信 酢酸菌 *Gluconobacter thailandicus* におけるジヒドロキシアセトン・リン酸化酵素の遺伝学的・生化学的解析, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 18 日~20 日, 京都女子大学 (京都府京都市)

② 寺田優花, 尾崎聖士朗, 片岡尚也, 足立収生, 赤壁善彦, 薬師寿治, 松下一信 *Gluconobacter* 属酢酸菌のキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素における新たな基質の発見とその反応メカニズムの提唱, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 18 日~20 日, 京都女子大学 (京都府京都市)

③ 小松和貴, 薬師寿治, 松谷峰之介, 吉原 望, 片岡尚也, 足立収生, 松下一信 *Gluconobacter* 属酢酸菌由来膜結合型キナ酸脱水素酵素の高発現, 日本農芸化学会 2016 年度中四国支部大会, 2016 年 9 月 15 日~16 日, 高知大学 (高知県高知市)

④小池尚史, 松谷峰之介, 片岡尚也, 薬師寿治, 松下一信 *Gluconobacter oxydans* における細胞内グルコース代謝の活性化, 日本農芸化学会中四国支部例会, 2016 年 1 月 23 日, 岡山県立大学 (岡山県総社市)

⑤ 平田花織, 松谷峰之介, 足立収生, 片岡尚也, 薬師寿治, 松下一信 酢酸菌 *Gluconobacter thailandicus* のジヒドロキシアセトン代謝に関する研究: ジヒドロキシアセトンリン酸化酵素, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 28 日~30 日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

⑥ 片岡尚也, 松谷峰之介, 薬師寿治, 松下一信 2-ケト-D-グルコン酸脱水素酵素の異種発による *Gluconobacter japonicus* での効率的 2,5-ジケト-D-グルコン酸生産, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 27 日~29 日, 岡山大学 (岡山県岡山市)

⑦ 小松和貴, 吉原 望, 今村志穂実, 片岡尚

也, 薬師寿治, 足立収生, 松下一信 酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* の膜結合型キナ酸脱水素酵素の高発現, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 27 日~29 日, 岡山大学 (岡山県岡山市)

〔図書〕 (計 1 件)

① Adachi, O. and Yakushi, T. (2016): Membrane-bound dehydrogenases of acetic acid bacteria. In Acetic acid bacteria: Ecology and Physiology (Edited by Matsushita, K. et al., ISBN: 978-4-431-55931-3), Springer, Berlin, 350 pages (pp. 273-297).

〔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
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 (Yakushi, Toshiharu)

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授
研究者番号 : 30324388

(2)研究分担者

松下 一信 (Matsushita, Kazunobu)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授 (特命)
研究者番号 : 50107736

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし