

酢酸菌の酸化発酵に関わるエネルギー代謝制御機構の解析

新井 博之

(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

研究の目的

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。不完全酸化は基質を菌体増殖のための同化反応や、完全分解による二酸化炭素生産に回さないために無駄な基質の消費が起らず、バイオプロセスによる物質生産へ応用する際に非常に有利である。不完全酸化反応はピロロキノリンキノン(PQQ)を補酵素とする膜結合型の脱水素酵素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するなど、有用物質生産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。本研究では、酢酸菌に特有の代謝特性について、エネルギー代謝制御と中央炭素代謝制御の観点から捉え直し、トランスクリプトーム解析により分子生物学的知見を集め、それらの知見に基づいた酢酸菌の産業利用法の開発を目的とする。

方法

1. トランスクリプトーム解析

酢酸菌の野生株 *Acetobacter aceti* NBRC14818、および、食酢醸造株 *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 の両菌株について、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。

2. グリオキシル酸経路の役割解析

A. aceti のグリオキシル酸経路を構成するイソクエン酸リアーゼ(*aceA*)とリンゴ酸シンターゼ(*glcB*)の遺伝子クラスターをテトラサイクリン耐性遺伝子(*tet*)で置換した DNA 断片を pUC18 上に構築し、*A. aceti* 野生株にエレクトロポレーションで導入した。テトラサイクリン耐性を示したコロニーから、相同組換えにより *aceA-glcB* が欠失した変異株を PCR によって選抜した。得られた変異株を用いて、野生株との生育プロファイルとトランスクリプトームの比較解析を行った。

結果

1. トランスクリプトーム解析

野生株 *A. aceti* NBRC14818 と食酢醸造株 *A. pasteurianus* NBRC3283 の両菌株に共通した特徴として、TCA 回路関連酵素の遺伝子発現がエタノールの存在により顕著に抑制されることが明らかとなった^{1, 2)}。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リン酸化により、生存に必要な 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代謝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、このことがエタノールの不完全酸化により酢酸が一時的に菌体外に蓄積される大きな要因の1つと考えられた (図1)。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り、両菌株の性質の差を反映すると考えられた。

2. グリオキシル酸経路の役割

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ザロ酢酸を補充するために必要とされる。酢酸蓄積性の高い *A. pasteurianus* などの食酢醸造株ではこの経路の遺伝子が欠損しているため、グリオキシル酸経路の有無は酢酸生産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酢

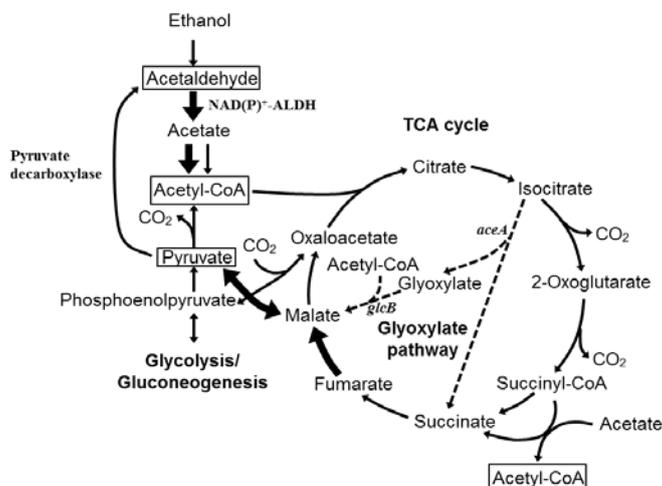


図1. *A. aceti*の中央代謝経路

グリオキシル酸経路を点線で示した。グリオキシル酸経路の欠損により発現が上昇する経路を太い矢印で示した。

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。トランスクリプトーム解析の結果、変異株では野生株よりも細胞内にアセチル CoA がより蓄積する可能性が示され、これが酢酸の過酸化が遅れる原因の一つと予想された(図1)³⁾。

結論

Acetobacter 属細菌のトランスクリプトーム解析の結果から、TCA 回路酵素遺伝子のすべてがエタノールにより発現抑制されることが明らかになった。これにより中央代謝系にアンバランスが生じ、アセチル CoA の消費が抑制されることが酢酸蓄積の原因と考えられた。酢酸菌は PQQ 型脱水素酵素とキノール酸化酵素から構成される短絡的な呼吸鎖電子伝達系を用いた呼吸により ATP 生産が可能である。エタノールなどの PQQ 型酵素の基質が存在する条件では、酢酸菌はこれらの利用を優先するために TCA 回路による NADH 供給を抑制する機構を有しており、これが不完全酸化の要因であると考えられた。また、食酢醸造株に見られるグリオキシル酸経路の欠失は、TCA 回路の機能をさらに低下させることで酢酸生産性の向上に寄与していることが示された。

文献

- 1) Sakurai, K., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2011) Transcriptome response to different carbon sources in *Acetobacter aceti*. *Microbiology* **157**: 899-910.
- 2) Sakurai, K., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2012) Changes in the gene expression profile of *Acetobacter aceti* during growth on ethanol. *J. Biosci. Bioeng.* **113**: 343-348.
- 3) Sakurai, K., Yamazaki, S., Ishii, M., Igarashi, Y., and Arai, H. (2013) Role of the glyoxylate pathway in acetic acid production by *Acetobacter aceti*. *J. Biosci. Bioeng.* **115**: 32-36.