

# 酢酸菌に特徴的な細胞表面酸化系代謝の細胞増殖における役割

薬師 寿治

山口大学大学院 創成科学研究科

## 研究の目的

酢酸菌はユニークな代謝系を持つ。酢酸発酵では、酢酸発酵の本質であるエタノールから酢酸への酸化反応が、細胞表面とも言うべきペリプラズムで行われている。これによって生じる還元力は、細胞膜内のユビキノンを通じて酸素を水に還元する際に用いられる (図1)。つまり、細胞表面での酸化反応は、呼吸鎖電子伝達系に繋がっており、プロトン駆動力という形でエネルギーを得て、最終的に ATP 合成に用いられる (1)。以上のように、細胞表面酸化では物質の酸化のみが行われるので、エネルギー生産のみに貢献する。一方、細胞分裂などに必要な同化代謝は細胞内で別途行われる。総合すると、酢酸菌の生育において、炭素源を取り込んで代謝する細胞内代謝系に、この細胞表面酸化系代謝がエネルギー供給を補助していると考えられる (1)。しかしながら、このような細胞表面代謝の生理学的意義はこれまで実験的に検討されたわけではないため、本研究で調査した。

酢酸菌の2つの代謝系(細胞表面代謝と細胞内代謝)を切り分けて解析することは容易ではない。例えば、グリセロール脱水素酵素 (GLDH) はグリセロールの2位の水酸基を特異的に酸化してジヒドロキシアセトン (DHA) を生産する。これが細胞表面代謝であるが、同時に少量のグリセロールあるいはDHAを取り込んで細胞増殖に利用する (図1)。

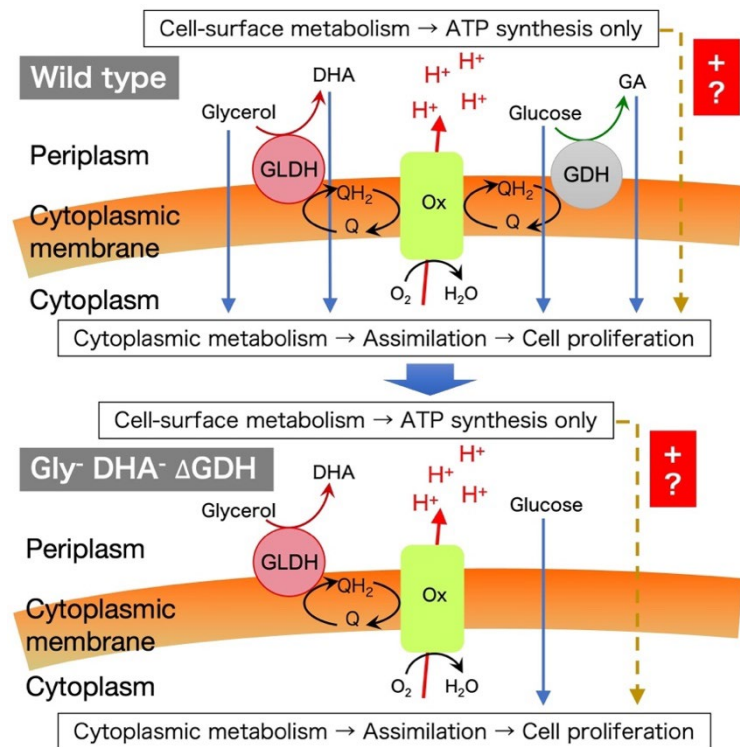


図1. *Gluconobacter thailandicus* の野生株と変異株のグリセロール代謝とグルコース代謝の概要と本研究の戦略.

野生株(上)では細胞表面代謝と細胞内代謝を切り分けることが難しい。グリセロールとその酸化産物DHAの細胞内代謝を遮断しグルコースの細胞表面代謝を遮断した変異株(Gly<sup>-</sup> DHA<sup>-</sup> ΔGDH, 下)を利用することで両者を切り分け、それぞれ単独、及び共存下での生育を評価することができる。

そこで私たちは、グリセロールおよび DHA の細胞内代謝を遮断して、グリセロールが細胞表面酸化系代謝しか受けられない変異株 (Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>) を構築した (2)。

この Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>変異株を基に、細胞表面代謝を受けず細胞内代謝のみを受ける物質で生育を検討できるような変異を導入した。酢酸菌の細胞内代謝で恐らく最も理解が進んでいるグルコースに着目した。野生株ではグルコースはその細胞表面でグルコース脱水素酵素 (GDH) によって酸化される。いくつかの酢酸菌で、GDH 破壊株でもグルコースを取り込んで代謝し、生育することが知られている。よって本研究では、Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>変異株の GDH をコードする遺伝子 (*gdhM*) を破壊し、Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>ΔGDH 変異株を作製した。この変異株は、グリセロールを細胞表面でのみ代謝し、グルコースを細胞内でのみ代謝する。つまり、細胞表面代謝と細胞内代謝を切り分けることができるので、この株で生育実験を行った。

## 方法

本研究では、酢酸菌の *Gluconobacter thailandicus* NBRC3255 株とそのグリセロールキナーゼ遺伝子 (*glpK*)、2つの DHA キナーゼ遺伝子 (*dhaK* ならびに *derK*) を破壊した Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>変異株 (KAO-7 株) を用いた (2)。この変異株はグリセロールから DHA を作るが、グリセロールの培地に生育できない。Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>変異株の GDH 遺伝子 (*gdhM*) を相同組み換えによって破壊し、Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>ΔGDH 変異株を作製した。加えて、Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>変異株の GLDH 遺伝子 (*sldBA*) を相同組み換えによって破壊し、Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>ΔGLDH 変異株を作製した。

生育実験には、グルコースとグリセロール両者を含む培地で前培養した。その前培養液をグルコースのみから成る培地、グリセロールのみから成る培地、グルコースとグリセロール両者を含む培地に移植し 30°C で振とう培養した。

## 結果

はじめに、構築した変異株の細胞表面酸化系酵素の活性を測定したところ、想定していた変異株が構築できたことが確認できた。次に、これら変異株の生育挙動を調べた (図 2)。Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>変異株では、グリセロールでの生育が全くみられなかった。一方、グルコース代謝は健全であるためグルコース培地では生育した。ここにグリセロールを添加すると、生育が良くなった (図 2 A)。この上昇分が、GLDH によってグリセロールを細胞表面代謝することで得たエネルギーに由来すると考えられる。この考えを検証するためにグルコース・グリセロール培地での生育を Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>ΔGLDH 変異株と比較したところ、Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>変異株よりも生育が悪かった (図 2 B)。この減少分が、GLDH によってグリセロールを細胞表面代謝することで得たエネルギーに由来すると考えられ、細胞表面代謝が生育をサポートするという仮説を支持する。

最後に、Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>ΔGDH 変異株からも細胞表面代謝の重要性を示す結果が得ら

れた。この株はグリセロール培地同様、グルコース培地でも生育できなかったが、グルコース・グリセロール培地では生育した（図2C）。この結果は、細胞質代謝だけでは生育できないが、細胞表層代謝からのエネルギー供給があれば生育可能になることを示している。つまり、本研究でたてた仮説を強く支持する結果となった。なお、Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>変異株と比較して最終到達濁度が高いのは、GDHを欠失しているがゆえにグルコースの酸化（グルコン酸の生産）ができず、pH低下が緩慢であった事が原因で、生育能が良かったと考えられる。以上、本研究の結果は、細胞表層代謝が細胞内代謝を、ひいては細胞増殖をサポートするという仮説を支持する。

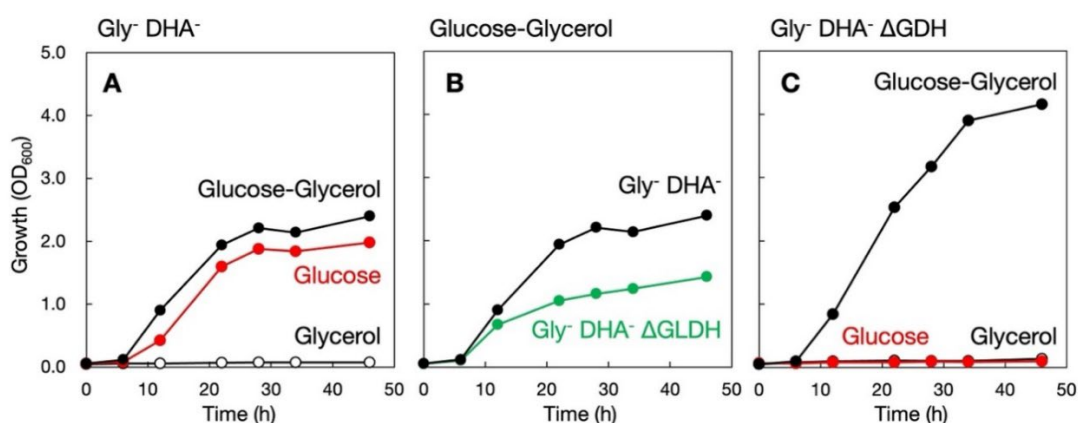


図2. *Gluconobacter thailandicus* 変異株のグルコースのみから成る培地、グリセロールのみから成る培地、グルコースとグリセロール両者を含む培地での生育。前培養はグルコース・グリセロール培地で行った。A, Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>変異株のグルコース培地（赤）、グリセロール培地（白）、グルコース・グリセロール培地（黒）での生育。B, グルコース・グリセロール培地での Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>変異株（黒）と Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>ΔGLDH 変異株（緑）の生育比較。C, Gly<sup>-</sup>DHA<sup>-</sup>ΔGDH 変異株の生育（シンボルはAと同じ）。

## 結論

酢酸菌では、細胞表層酸化系代謝が生み出すエネルギーが、同化代謝や細胞分裂に必要なエネルギーを供給してその生育能を保証する。

## 文献

- 1) Matsushita, K., Toyama, H., and Adachi, O. (1994) Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **36**: 247-301.
- 2) Kataoka, N., Hirata, K., Matsutani, M., Ano, Y., Nguyen, T. M., Adachi, O., Matsushita, K., and Yakushi, T. (2021) Three ATP-dependent phosphorylating enzymes in the first committed step of dihydroxyacetone metabolism in *Gluconobacter thailandicus* NBRC3255. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **105**: 1227-1236.