

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成 18 年度博士課程 入学  
氏 名 櫻井 健太  
指導教員名 五十嵐 泰夫

論文題目 酢酸菌のエタノール代謝に関する研究

### 1. はじめに

酢酸菌は振とう培養や静置培養下でエタノールを酸化することで酢酸を生成する。生成された酢酸は、一時的に培養液中に蓄積された後にさらに酸化される。振とう培養下ではエタノール酸化と酢酸酸化が分かれて起きることで、酢酸菌は三段階の生育期を示す。各生育期は培養開始から順に、エタノール酸化と酢酸蓄積が起きるエタノール酸化期、定常期、および、蓄積した酢酸を酸化する酢酸酸化期と呼ばれている。エタノール酸化期と酢酸酸化期では増殖がみられるが定常期では生育が停滞することから、**diauxic** な生育曲線を示す。エタノールの消費後に酢酸酸化が始まるまでの定常期は菌株ごとに時間が異なることが知られており、この期間の長さが酢酸醸造に重要な要因になっている。酢酸菌は静置培養でもエタノールの酸化により生成した酢酸を培養液中に蓄積する。また静置培養下で酢酸菌は菌膜を形成する。菌膜は細胞と多糖類で構成され培養液表面に浮遊するため、エタノール酸化に必要な酸素の獲得や、エタノールや酢酸に対する耐性の獲得の役割があるとされており、酢酸生産に必須なものと考えられてきた。本研究では酢酸菌によるエタノール代謝の視点から、酢酸蓄積や、菌膜形成と酢酸生産との関係に関する基礎的な知見を得ることを目的とし、菌株間の酢酸蓄積性や菌膜形成性の比較、ドラフトゲノム解析やト

ランスクリプトーム解析を行った。

## 2. 培養条件と酢酸生成との関係

*Acetobacter aceti* NBRC14818 と *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 を用いて、振とう培養と静置培養の二つの培養条件下で、生育や菌膜の変遷と培養液中のエタノールの消費や酢酸の蓄積を経時的に解析した。振とう培養下で両株はエタノールの消費に伴って酢酸を蓄積したが、*A. aceti* はエタノール消費直後に蓄積した酢酸を急激に消費した。一方で、*A. pasteurianus* はエタノール消費から 36 時間後に蓄積した酢酸を穏やかに消費した。静置培養下では、*A. aceti* はエタノールを消費したにもかかわらず酢酸をあまり蓄積せず、エタノール消費後に蓄積した酢酸を急激に消費した。静置培養時の *A. aceti* による酢酸の蓄積はグルコースの影響を受けなかった。一方、*A. pasteurianus* は振とう培養時と同様にエタノール消費に伴った酢酸蓄積を示した。また、エタノール培地では *A. aceti* は *A. pasteurianus* よりも高い菌膜形成性を示した。

## 3. エタノール酸化酵素活性の測定

酢酸菌によるエタノール酸化と酢酸生成は次のように考えられている。エタノールは Alcohol dehydrogenase (ADH) によってアセトアルデヒドに酸化され、このアセトアルデヒドは Aldehyde dehydrogenase (ALDH) によってさらに酸化されることで酢酸が生成する。ADH には PQQ 依存型と NAD(P)<sup>+</sup>依存型があり、それぞれ細胞膜上と細胞質に局在する。また、ALDH にも膜結合型と細胞質型が存在する。そのため膜結合型の ADH と ALDH によってエタノールが酸化されると酢酸は細胞外に生成するのに対し、細胞質型の ADH と ALDH の場合は酢酸は細胞内に生成する。膜結合型の ADH と ALDH によってエタノールが酸化されることで得られた電子は直接電子伝達系に渡され、エネルギー生産が行われる。*A. aceti* と *A. pasteurianus* の振とう培養と静置培養時の PQQ-ADH と NAD(P)<sup>+</sup>-ADH の活性を比較したところ、培養条件に関わらず *A. aceti* は NAD(P)<sup>+</sup>-ADH、*A. pasteurianus* は PQQ-ADH の活性の割合が高かった。ALDH についても ADH と同様の結果が得られた。これらの結果から *A. aceti* は *A. pasteurianus* に比べて細胞質におけるエタノール酸化の割合が高く、酢酸は細胞内に生成しやすいことが示唆された。

#### 4. *A. acetii* のドラフトゲノム解析と比較ゲノム解析

*A. acetii* のゲノム DNA の塩基配列を Illumina Genome Analyzer II を用いて決定した。Edena によるアセンブルを行い 1488 個の contig からなる約 3.6 Mb の配列を得た。次いで、CRITICA と glimmer2 による遺伝子領域予測と BLAST によるアノテーションを行った。全ゲノム配列が得られている他の酢酸菌との比較により *A. acetii* のエネルギー代謝系や炭素代謝系の解析を行った。*A. acetii* は TCA サイクルを構成する遺伝子を全て保持していた。一方、*A. pasteurianus* では succinyl-CoA synthetase が欠損していたが、欠損部分をバイパスする acetyl-CoA hydrolase を保持していた。この遺伝子は *A. acetii* にもみられた。*A. acetii* は酢酸など acetyl-CoA を生じる基質を同化する際に必要な TCA サイクルの補充経路であるグリオキシル酸回路を構成する遺伝子を保持していた。一方で、*A. pasteurianus* はこの回路の遺伝子が欠損していた。呼吸鎖関連遺伝子にも違いがみられた。*A. acetii* は 3 つのシアン耐性 quinol oxidase を持っており、系統解析により、1 つは cytochrome *bd*-type (*cyd*) であり、2 つは cyanide-insensitive-type (CIO) であることが示唆された。2 つの CIO のうち一方は *A. pasteurianus* は保持していなかった。

#### 5. *A. acetii* のエタノール代謝時のトランスクリプトーム解析

*A. acetii* をエタノール培地で、振とうまたは静置培養した。振とう培養ではエタノール酸化期前期・後期、定常期、酢酸酸化期でサンプリングした。静置培養ではエタノールが培地中に残っている地点で菌膜を回収した。これらのサンプルから RNA を抽出しマイクロアレイ解析した結果、酢酸から acetyl-CoA を生成する acetyl-CoA synthetase はエタノール酸化期後期以降急激な発現強度の上昇を示し、静置培養でも発現がみられた。TCA サイクルを構成する遺伝子は、振とう培養では培養時間の経過とともに発現強度が徐々に上昇し、静置培養でも高い発現強度を示した。グリオキシル酸回路を構成する遺伝子は、エタノール酸化後期以降に急激な発現強度の上昇を示し、静置培養でも高い値を示した。多くの ADH と ALDH は恒常的に発現していたことから、振とう培養・静置培養に関わらず酢酸は培養初期の段階から細胞内外に生成していたと考えられる。そのため、振とう培養の酢酸酸化期以前の早い時期や菌膜において、TCA サイクルやグリオキシル酸回路の遺伝子の発現強度が上昇したと考えられる。また、グルコース培地で振とう培養を行うと、エタノール培地に比べてグリオキシル酸回路の遺伝子の発現強度のみ低下した。これらの結果により、*A. acetii* においてエタノールの酸化によって生成した酢酸は主に TCA サイクルとグリオキ

シル酸回路により同化されることが示唆された。

また菌膜に特異的な遺伝子発現パターンとして、一部の **ALDH** の顕著な発現や、走化性や運動性に関する遺伝子の発現強度の著しい低下がみられた。

## 6. まとめ

*A. acetii* は細胞質タイプの **ADH** と **ALDH** の活性の割合が高く、グリオキシル酸回路を構成する遺伝子を保持していた。また、エタノールの酸化によって生成した酢酸は **TCA** サイクルとグリオキシル酸回路を通して代謝されることが示唆される発現プロファイルが得られた。これらの結果から、*A. acetii* はエタノールを異化的と同化的のどちらにも代謝すると考えられる。そのため振とう培養時のエタノール消費後にみられた急激な酢酸消費や、静置培養時にエタノールを消費したにも関わらずあまり酢酸を蓄積せず、さらに蓄積した酢酸の急激な消費がみられたと考えられる。また、酢酸の一部は菌膜の構成成分である多糖の生合成に必要な炭素源として同化されたために高い菌膜形成性を示したと考えられる。

*A. pasteurianus* は細胞膜タイプの **ADH** と **ALDH** の活性の割合が高く、グリオキシル酸回路を構成する遺伝子を保持していなかった。これらの結果から、*A. pasteurianus* はエタノールを異化的に代謝しやすいと考えられる。そのため振とう培養時のエタノール消費後の酢酸消費が穏やかで、静置培養時には振とう培養と同様にエタノールの消費にともなった酢酸の蓄積を示し、菌膜形成性も低かったと考えられる。特に菌膜では **NAD<sup>+</sup>-ADH** 活性が検出されなかったことから、エタノールはより異化的に代謝されるため効率的に酢酸が培養液中に蓄積するので、*A. pasteurianus* において静置培養は酢酸生産に有益であると考えられる。*A. pasteurianus* は酢酸醸造の産業利用菌株として繰り返し利用されることで、より酢酸を蓄積しやすい形質に変化していったことが予想される。

本研究では、酢酸菌によるエタノール代謝特性と、酢酸蓄積や酢酸生産と菌膜形成との関係が明らかになり、ここで得られた知見は食酢醸造の安定化などへの貢献が期待される。