

論文の内容の要旨

論文題目 酢酸菌のクオラムセンシングシステムに関する研究

氏名 飯田 彩

【背景】

近年、様々な微生物が細胞密度に依存して標的遺伝子の転写を制御する細胞間コミュニケーションシステムを有していることが報告されている。このシステムはクオラムセンシングシステムと呼ばれ、二次代謝物質の生産、発光、運動性、プラスミドの伝達、毒素生産、バイオフィルムの形成などの重要な機能を制御していることが知られている。微生物は、自らが生産し、細胞内外に拡散するシグナル物質の濃度によって、細胞密度を感知する。多くのグラム陰性細菌は、アシルホモセリンラクトン(AHL)をシグナル物質としたクオラムセンシングシステムを有している。AHLに依存したクオラムセンシングシステムではLuxRファミリーとLuxIファミリーの2つのタンパク質が重要な役割を果たす。LuxIファミリーのタンパク質はAHL合成酵素として機能し、AHLを合成する。細胞密度の増加に伴って、AHLの濃度が増加すると、AHLはAHLの受容体であり、転写制御因子として機能するLuxRファミリーのタンパク質と結合して複合体を形成する。この複合体は標的遺伝子のプロモーター領域にある結合配列 *lux box* に結合して、標的遺伝子の転写を活性化する。

酢酸菌はグラム陰性の好気性細菌で、エタノールや様々な糖を有機酸に酸化する能力を有している。この酸化反応は酸化発酵と呼ばれ、特にエタノールを酸化して酢酸にする反応は酢酸発酵と呼ばれる。酢酸菌の中でも、*Gluconacetobacter* 属と *Acetobacter* 属は、高いエタノール酸化能と酢酸耐性能を有することから、食酢の製造に広く利用されており、食酢製造を効率的に行なうため、酢酸生産能の高い菌株の育種が望まれている。そこで、本研究では、食酢製造への応用を目標として、多くの微生物で重要な機能を制御するクオラムセンシングに着目し、研究開始時には全く解析が行なわれていなかった酢酸菌のクオラムセンシングシ

システムの解析を行なった。

【結果】

1. 酢酸菌 *Gluconacetobacter intermedius* はクオラムセンシングシステムによって酢酸発酵を制御している¹⁾

レポーターアッセイと LC/MS 分析により、*G. intermedius* が 3 種類の AHL を生産することを示した。また、*G. intermedius* NCI1051 から、*luxI*、*luxR* のホモログである *ginI*、*ginR* をクローニングし、塩基配列を決定した。*ginI* の転写開始点の上流には LuxR ファミリーのタンパク質の結合配列である *lux box* と相同性の高い配列が存在した。転写解析によって、既知の *luxR/luxI* と同様、*ginI* の転写は GinR によって正に制御されていることが示唆された。また、RT-PCR により、*ginI* の転写単位を調べたところ、*ginI* は *ginI* のすぐ下流に存在し、89 アミノ酸からなる機能未知の小さなタンパク質をコードする *ginA* とオペロンを形成していることが示唆された。以上より、*G. intermedius* NCI1051 は、AHL 依存性で、GinI/GinR から成るクオラムセンシングシステムを有していることが示唆された。加えて、GinI/GinR クオラムセンシングシステムの標的遺伝子として *ginI* のすぐ下流に位置する *ginA* を見出した。

次に、遺伝子破壊により、GinI/GinR クオラムセンシングシステムが何を制御しているかを調べた。*ginI* 破壊株、*ginR* 破壊株をエタノールを含む培地で培養したところ、野生株に比べて、両破壊株の生育が向上した。一方、エタノールを含まない培地で培養した際には野生株と破壊株で生育の違いは見られなかった。従って、この生育の向上は酢酸発酵の基質であるエタノールに依存しており、*ginI*、*ginR* の破壊が酢酸発酵に関与していることが予測された。そこで、ミニジャーファーマンターを使用して、酢酸発酵能を比較したところ、*ginI* 破壊株、*ginR* 破壊株は、野生株と比較して、酢酸の生産量が顕著に増加し、酢酸菌のクオラムセンシングシステムが酢酸発酵に関与していることが示唆された。更に、GinI/GinR クオラムセンシングシステムの標的遺伝子として見出された *ginA* の破壊株でも同様の試験を行なったところ、野生株と比較して、*ginI*、*ginR* 破壊株と同様、酢酸生産量の増加が見られた。また、野生株と比較して、*ginI*、*ginR*、*ginA* の破壊株の培養液は、特に対数増殖期において、食酢製造時に問題となっている培養中の発泡が顕著に減少することがわかった。以上の結果から、酢酸菌 *G. intermedius* は 3 種類の AHL に依存した GinI/GinR クオラムセンシングシステムを有しており、GinA を介して、酢酸菌の特徴的な性質である酢酸発酵とグルコン酸発酵を含む酸化発酵に加え、消泡活性を負に制御していることが示唆された。この結果はクオラムセンシングと酢酸発酵の関与を示した初めての報告である。

2. クオラムセンシングシステムの制御下にある OmpA ファミリーのタンパク質 GmpA の酢酸発酵への関与²⁾

GinI/GinR クオラムセンシングシステムの標的遺伝子を同定し、GinI/GinR クオラムセンシングシステムによって、どのように酢酸発酵が制御されているのかを明らかにすることを目

的として、二次元電気泳動によるプロテオーム解析を行なった。その結果、GinI/GinR クオラムセンシングシステムに応答するタンパク質を見出した。このタンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定したところ、このタンパク質は OmpA ファミリーのタンパク質であることが判明し、GmpA と命名した。gmpA は3つの隣あった相同性のある遺伝子 gmpABC を含む遺伝子クラスター中に位置していた。このクラスターは *Gluconacetobacter polyoxogenes* などの食酢製造菌に特異的に存在した。GmpA は β -バレル型の膜貫通ドメインを形成する N 末端領域に特徴があり、表面に露出したループの1つに余分な配列を有しているが、その後の解析により、この配列が gmpA の機能に重要であることが示唆された。転写解析によって、3つの隣あった gmp 遺伝子のうち、gmpA の転写だけが GinI/GinR クオラムセンシングシステムによって活性化されることが示された。さらに、gmpA は GinR によって直接制御されているのではなく、このクオラムセンシングシステムの標的遺伝子として同定された 89 アミノ酸のタンパク質 GinA を介して制御されていることが示唆された。次に、gmpA 破壊株を作製し、酢酸発酵への影響を調べた。その結果、gmpA 破壊株は ginA 遺伝子の破壊株と同様に、野生株に比べて酢酸の生産量が増加し、同時にグルコン酸の生産量も増加した。以上の結果から、gmpA は GinA を介して制御され、クオラムセンシングシステムによる酸化発酵の抑制に関与していることが明らかになった。GmpA は外膜タンパク質として機能し、酢酸やエタノールの耐性に関与しているのではないかと考えられるが、その詳細の解明は今後の課題である。

3. クオラムセンシングシステムの制御下にある4つの遺伝子の解析³⁾

gmpA 以外の GinA の標的遺伝子を同定し、クオラムセンシングシステムによる酢酸発酵の制御機構を明らかにすることを目的として、近縁種である *G. polyoxogenes* の DNA マイクロアレイを使用したトランスクリプトーム解析を行なった。その結果、GinA によって誘導される4つの新規な遺伝子 (*gltA*、*pdeA*、*pdeB*、*nagA*) を同定し、遺伝子破壊により、酸化発酵と消泡活性への関与を調べた。4つの遺伝子のうち、*nagA* (putative *N*-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase)の破壊は予想外なことに、生育速度の減少をもたらした。一方、*gltA* (putative glycosyltransferase) と *pdeA* (putative cyclic-di-GMP phosphodiesterase)は酢酸発酵とグルコン酸発酵を含む酸化発酵に負の影響を与えることが示された。更に、*gltA* は消泡活性を抑制していることも示唆された。*pdeB* 破壊株は何の表現型の変化も示さなかった。これらの結果は、gmpA 以外に、少なくとも2つの GinA 誘導性遺伝子 (*gltA*、*pdeA*) が GinI/GinR クオラムセンシングシステムによる酸化発酵の抑制に関与しており、クオラムセンシングシステムによる酸化発酵の抑制には複雑なメカニズムが存在することを示していると考えられる。

【総括】

本研究では、酢酸菌が AHL 依存性のクオラムセンシングシステムを有していることを初めて明らかにした。そして、酢酸菌 *G. intermedius* NCI1051 において、GinI/GinR クオラムセンシングシステムが、GinA を介して、酢酸菌の最も特徴的な性質である酢酸発酵、グルコン酸発酵を含む酸化発酵を負に制御していることを明らかにした(下図)。加えて、クオラムセンシングシステムが、食酢製造時に問題となる発泡にも影響を与えていることを見出した。クオラムセンシングシステムによる酢酸発酵と消泡活性の制御機構には不明な点が残されているものの、本研究で得られた知見は、酢酸菌の育種に有用であり、食酢製造への応用が期待される。

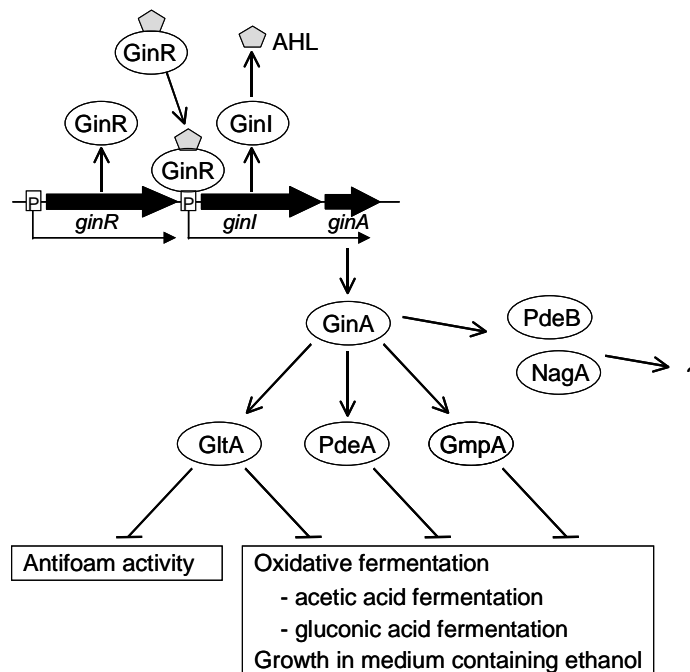


図. 酢酸菌 *G. intermedius* NCI1051 のクオラムセンシングシステムのモデル図

- 1) Iida, A., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2008) Control of acetic acid fermentation by quorum sensing via *N*-acylhomoserine lactones in *Gluconacetobacter intermedius*. *J. Bacteriol.* 190: 2546–2555.
- 2) Iida, A., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2008) An OmpA family protein, a target of the GinI/GinR quorum-sensing system in *Gluconacetobacter intermedius*, controls acetic acid fermentation. *J. Bacteriol.* 190: 5009–5019.
- 3) Iida, A., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2009) Identification and characterisation of target genes of the GinI/GinR quorum-sensing system in *Gluconacetobacter intermedius*. *Microbiology.* 155: 3021-3032.