

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年～2012 年

課題番号：22510222

研究課題名（和文） 特殊な代謝系を有する酢酸菌のゲノム解析と  
バイオマスの糖化における応用

研究課題名（英文） Utilization of biomass resources based on genome  
analyses of acetic acid bacteria

研究代表者

東 慶直（AZUMA YOSHINAO）

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：90333509

研究成果の概要（和文）： 全ゲノム DNA 配列を決定した酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の代謝組織図をゲノム情報に基づく細菌の代謝経路ごとのデータを導入し、網羅的にかつ俯瞰できる代謝全体像を描き出した。その代謝経路図を用いて、ゲノム情報を解読した *Gluconacetobacter xylinus* など合計で 25 菌種の酢酸菌のゲノム情報を利用可能な酢酸菌類縁菌の代謝を一瞥で比較できる比較代謝経路図を自動的に作成するシステムを完成させた。*A. pasteurianus* はグリセロールを唯一の炭素源として増殖し、酵母の増殖を促す分子量 180 の中和糖を生産する。この酢酸菌を用いて、粗グリセロールを用いたバイオエタノールの生産のための複合発酵系を構築した。グリセロール代謝や有用代謝経路の発掘とともに、酢酸菌の有用形質の融合法に関して特許申請した。

研究成果の概要（英文）： Acetic acid bacteria (AAB) are characterized by their ability to transform alcohols and sugar-alcohols into their corresponding organic acids. To acquire new metabolic systems practicable in high sugar concentration and to achieve a model system to comprehend environmental responses of AAB, we have performed comparative genome, transcriptome and proteome analyses First, to determine draft genome DNA sequences of 25 AAB, we carried out DNA sequencing, assembling and gene extraction by using a next generation sequencer. We will present our recent data for the metabolic and gene regulations by the stress of high glucose concentration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：

(1) 酢酸菌 (2) *Acetobacter pasteurianus* (3) バイオエタノール (4) グリセロール代謝 (5) 代謝マップ (6) *Gluconacetobacter xylinus* (7) ゲノム解析 (8) バクテリア・セルロース

## 1. 研究開始当初の背景

酢酸菌は根粒細菌やリケッチア菌と同様に  $\alpha$ -proteobacteria に属する細菌群で、植物の果実や土壌に棲息し酵母や乳酸菌と共生している。酢酸菌の多くが酵母の生産するエタノールから酢酸を生産する。酢酸菌は高い酸耐性を有しており、増殖のためのニッチを自ら構築する。酢酸生産能の高い菌種は伝統的に食酢醸造に用いられる。酢酸菌はグルコン酸発酵など発酵産業でも利用され、さらに酢酸菌の酸化還元酵素は血糖値測定のパイオセンサーなどに広く利用されている。酢酸菌の有用遺伝子の取得や発酵産業における新規利用法の探索や  $\alpha$ -proteobacteria 菌群のゲノム進化の解明を目的とした。

酢酸菌を扱う研究者や技術者の間では酢酸菌の易変異性が観察・報告されており、形質を維持するための経験的な対策が長年にわたり講じられてきた。本件申請者がゲノム解析した *A. pasteurianus* IF03283 株も、発酵研究所(後に NITE-NBRC に移管)に寄託された 1954 年から凍結乾燥保存方法が確立されるまでの約 20 年間、変異体のクローン化を避けるためスラントでの継代培養により維持された。そのため、凍結乾燥保存方法に置き換わった直後の 1974 年公式保存株 (NITE-NBRC で管理される最古の試料)には、明らかに形態・形質の異なる多型の混在した。本件申請者はこの多型混合系から個別菌株を分離することなくゲノム DNA 配列の解読を行い、著しい数のトランスポゾンやプラスミド、極めて変異しやすいマイクロサテライト

を有する複製関係遺伝子など酢酸菌の易変異性の起因となるゲノムの特性を明らかにした。また試験管内高速進化実験系を用いて得られた酢酸菌の高温耐性株のゲノム解析も行い、リケッチアなどで観察されるゲノムの縮小化が酢酸菌においては試験管内でも観察されることを示した。

ゲノム解析の急速な進展とともにゲノム中の遺伝子構成を直感的に把握するための解析プラットフォームの開発も進んでいる。KEGG2 や BioCyc などがその代表例である。しかし、モデル生物でさえ全遺伝子の数分の 1 が機能未知であることや酢酸菌のような特殊な菌のその特殊性の表現は既存のプラットフォームでは困難である。本研究計画では、生化学的な検証を十分に加えつつ複数の酢酸菌種の有する全代謝系の組織図を描写し、最終的にコンピュータによるシミュレーションが可能な代謝解析システムを構築する。一方、予備的な酢酸菌のゲノム情報解析と実験的代謝解析から、*A. pasteurianus* はグリセロールから効率よく糖を生産することと *G. xylinus* はセルロースを糖化することが明らかとなった。実際に *A. pasteurianus* はバイオマスの 1 つである廃食用油からのバイオディーゼル生産における副産物の粗グリセロールを資化し糖を生産した。本研究計画では、エタノール生産のための酢酸菌と酵母との複合発酵系の開発など基礎実験を実施する。

## 2. 研究の目的

### (1) 複数の酢酸菌種の全代謝系組織図とシミュレーションが可能な代謝解析システムの構築

本申請者が中心となり全ゲノム DNA 配列を決定した酢酸菌 2 菌種、本邦伝統的酢酸発酵菌 *A. pasteurianus* とバクテリア・セルロース生産菌 *G. xylinus* について、KEGG2 や BioCyc などのゲノム解析プラットフォームと一般的な教科書、酢酸菌の特徴を議論した論文を参考にして、代謝関連酵素の整理や膜タンパク質の機能分類を行っている。現在までのゲノム解析に基づく予備的な代謝解析から、アミノ酸やビタミンが非必須であること、菌種により炭素源としての糖の嗜好傾向が異なることが予想された。培養実験などによりいずれの予想も正しいことが証明され、酢酸菌の代謝を俯瞰できる代謝図の作成は有用物質生産の経路探索や酢酸菌の進化的議論に極めて有用であることが確認された。本研究課題においてはまず、これまでのゲノム解析情報を統合し酢酸菌の代謝全体を俯瞰できる代謝組織図を作成し、さらに他の酢酸菌のゲノム情報を加えて比較ゲノム代謝組織図を完成させる。

代謝解析ツールである KEGG2 や BioCyc は極めて強力なシステムであり拡張性も高いが、代謝図が各経路ごとに分散しており代謝全体像を把握することは困難である。また、特殊な菌の特殊性を表現することも困難である。そこで酢酸菌の比較ゲノム代謝組織図の作成においては、Cell Illustrator や Cell Designer、KEGG2、XML の技術を十分に利用して、酢酸菌の複数種の代謝を比較解析でき、代謝シミュレーションが可能となるシステムを構築する。さらに、ゲノム情報の未知な酢酸菌についてゲノムのドラフト配列を決定し、酢酸菌群における有用物質生産のための

代謝経路の探索を行う。有望な経路が発見された場合、速やかに基礎的な解析を進める。

### (2) 酢酸菌と酵母との複合発酵系によるエタノール生産の開発

酢酸菌 *A. pasteurianus* の多型混合系より分離した一群の株 (3283-01 群) は、グリセロールを唯一の炭素源として正常に増殖し、培養液中に高濃度の分子量 180 の中和糖を蓄積する。近年、廃棄食用油からのバイオディーゼル生産が増加してきているが、同時に大量に産生される粗グリセロールの有効利用は限られており多方面で再利用法が検討されている。酢酸菌株 (3283-01) を粗グリセロールを炭素源として培養したところ、正常に増殖し糖を蓄積することが分かった。その糖は酵母増殖に利用可能であった。酢酸菌による粗グリセロール糖化の効率化に関しては、この株やその耐熱株から試験管内高速進化実験系を用いての高効率株の作成や NBRC の保存菌からの高効率株の同定を試みる。酵母に関しても適切な株の選択を試みる。最終的には、粗グリセロールからエタノールを生産する複合発酵系を実験室レベルで完成させる。

一方、*G. xylinus* はバクテリア・セルロース生産菌として有名であるが、ゲノム解析から複数のセルロースの分解遺伝子が同定された。*G. xylinus* が生産するセルロースの分解を *G. xylinus* 自身で行ったところ、セルロースを分解し中性糖を産出することが明らかになった。本件申請においては、試験管内高速進化実験系を用いて高効率で耐熱性のセルロース分解株を育種し、酵母が利用可能な糖の生産、さらにはエタノール生産における新たなセルロース・バイオマス利用にむけた基礎的な実験を行う。

### 3. 研究の方法

- (1) 酢酸菌 *A. pasteurianus* の代謝組織図については、豊富に存在する細菌の代謝に関する教科書や酢酸菌の代謝に関する文献を参考に、さらに KEGG2 や BioCyc のゲノム情報に基づく細菌の代謝経路ごとのデータを導入し、網羅的にかつ俯瞰できる代謝全体像を描き出す。難問であるトランスポーターなどの膜タンパク質の同定は SOSUI や P-SORT を用い、基質に関しては既知の酵素との比較に基づき行う。複雑に交差する反応経路の描写方法については、テキスト記述が一部自動化できなくなるかも知れないが、可能な限りカラーや曲線を用い混乱を避ける。
- (2) 作成した代謝経路をもとにデータをテキスト化し、既存の Cell Illustrator や Cell Designer、KEGG2、XML の技術を十分に利用して、シミュレーションが可能となるシステムを構築する。多くのシステムバイオロジー分野におけるシミュレーションが酵素の反応速度のデータを基盤にしているのと比較した場合、ここで構築を進めるのは遺伝学的なシミュレーションで、速度は考慮しない。
- (3) 最終的に本件申請者がゲノム情報を解読している *A. pasteurianus* と *G. xylinus* に加え、ゲノム情報を利用可能な酢酸菌類縁菌の代謝を一瞥で比較できるように代謝経路図を加工する。図 2 に既に本申請者が作成した KEGG を元にする比較代謝経路図の一部を示す。更に特殊な代謝経路の存在が予想される酢酸菌について（たとえばバクテリア・セルロースの高効率生産酢酸菌や高濃度グリセロール条件下で増殖可能な酢酸菌）新規にそのゲノムのドラフト DNA 配列を決定し、代謝マップへの導入を図る。
- (4) *A. pasteurianus* 3283-01 株は、グリセロールを唯一の炭素源として増殖し、酵母の増殖を促す分子量 180 の中和糖を生産する。

この酢酸菌を用いて、粗グリセロールを炭素源として培養したところ、正常に増殖し糖を蓄積した（図 3 に粗グリセロールの形状と酢酸菌の培養を示す）。本研究では、グリセロールの糖化効率のより高い菌の NITE-NBRC 保存菌株からの選択と試験管内高速進化実験系を用いた 3283-01 株の高効率株への育種を試み、さらに酵母との適切な組み合わせを検討することにより、粗グリセロールを用いたバイオエタノールの生産のための複合発酵系を構築する。酢酸菌株 (3283-01) に由来する 42 度熱耐性株と 42 度でエタノール発酵が可能な酵母 *Kluyveromyces marxianus* の複合発酵系による高温発酵系の開発にも取り組む。

(5) 酢酸菌の代謝比較解析システムの開発の進捗に従い、代謝シミュレーションの信頼性を検証するための生化学実験を行い、必要に応じシステムの改良・調整を進める。また、ゲノムのドラフト解析を行った有用酢酸菌の解析結果をシステムに加え、システムの改善と有用物質の生産系の発掘を進める。重要な経路に関しては速やかに確認の実験を進める。

(6) 廃グリセロールからのエタノール発酵に関しては、酢酸菌と酵母の最適な組み合わせと発酵条件を導きだし、エタノールの複合発酵系の最適化を図る。農林水産省の発表では 2008 年に生産消費された食用油は 1,730,618 トンで、その大部分は使用後に産業廃棄物や生ゴミとして処理されている。この使用済みの食用油からのバイオディーゼルの生産に関して日本で先進的に取り組む京都市では年間 1,000 トン以上のバイオディーゼルが生産され、200 トン以上もの副産物グリセロールが廃棄されている。実際このグリセロールの処理を検討している企業は少

なくなく、可能な限り企業と提携を結び、実用化に向けた試験を展開する。

(7) *G. xylinus* は高純度のセルロースを生産する菌として有名である。その *G. xylinus* が生産するセルロースを *G. xylinus* 自身で分解させたところ、セルロースを分解し中性糖を産出した。

本件申請においては、試験管内高速進化実験系を用いて高効率にセルロース分解する耐熱性酢酸菌を育種・作製する。酢酸菌から同定したセルロース糖化・分解酵素を遺伝子工学的に耐熱化するなど、菌体によらない効率的なセルロースの分解系の確立も進める。それらのセルロース分解菌や酵素が分解を得意とするセルロースの種類を調査解析し、最終的には酵母が利用可能な糖の生産さらにはエタノール生産における複合（連続）発酵系開発のための基礎的な実験を行う。

#### 4. 研究成果

全ゲノム DNA 配列を決定した酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の代謝組織図を、豊富に存在する細菌の代謝に関する教科書や酢酸菌の代謝に関する文献を参考に、さらに KEGG2 や BioCyc のゲノム情報に基づく細菌の代謝経路ごとのデータを導入し、網羅的にかつ俯瞰できる代謝全体像を描き出した。トランスポーターなどの膜タンパク質の同定は SOSUI や P-SORT を使い、基質に関しては既知の酵素との比較に基づき同定した。

完成させた *A. pasteurianus* の代謝経路図を用いて、さらにゲノム情報を解読した *Gluconacetobacter xylinus* などゲノム情報を利用可能な酢酸菌類縁菌の代謝を一瞥で比較できる比較代謝経路図を自動的に作成するシステムを完成させた。ただし、特定の酢酸菌が有する特殊な代謝経路および複雑

に交差する反応経路の描写方法については、基本的な代謝マップ作成法は完成したが、実際の代謝との関連・相関性を確認中である。

*A. pasteurianus* 3283-01株は、グリセロールを唯一の炭素源として増殖し、酵母の増殖を促す分子量180の中和糖を生産する。この酢酸菌を用いて、粗グリセロールを炭素源として培養したところ、正常に増殖し糖を蓄積することが明らかとなった。粗グリセロールを用いたバイオエタノールの生産のための複合発酵系を構築することをめざし、筑野食品工業株式会社の協力を得て開発を進めている。また、高濃度グリセロール代謝能を有する酢酸菌の育種を進めている。既に得られた育種株については、次年度ゲノム解析を進める予定である。

合計で25菌種の酢酸菌のゲノムDNA配列を決定し、遺伝子を抽出しDDBJに登録した。グリセロール代謝や有用代謝経路の発掘とともに、酢酸菌の有用形質の融合法に関して特許申請した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① T. Furuzono, T. Iwamoto, Y. Azuma, M. Okada, Y. Sawa, Preparation of carboxylated Ag nanoparticles as a coating material for medical devices and control of antibacterial activity, *Journal of Artificial Organs in printing*. (2013)
- ② H. Ogino, Y. Azuma, H. Nakazawa, M. Matsutani, A. Hasegawa, K. Otsuyama, K. Matsushita, N. Fujita, M. Shirai, Complete genome sequence of a cellulose-producing bacterium, *Gluconacetobacter xylinus* NBRC 3288, isolated from vinegar., *J. Bacteriology*, Dec; **193** (24):6997-8 (2011)

[学会発表] (計27件)

- ① H. Hadano, N. Higashiura, H. Hirakawa, S. Takebe, K. Matsushita, Y. AZUMA, Genome

analyses for hyper glucose tolerance of acetic acid bacteria, *Tanticharoenia sakaeratensis* and *Asaia bogorensis*.、2013年度日本農芸化学会大会、東北大学、3/27/2013

② H. Hadano, N. Higashiura, H. Hirakawa, S. Takebe, K. Matsushita, Y. Azuma, Genome Analyses for High Glucose Tolerance of Acetic Acid Bacteria, 113rd General Meeting: American society for Microbiology, Denver, USA, March 20, 2013

③ 波多野裕美、東裏典枝、高見晶子、平川英樹、武部 聡、松下一信、東 慶直、酢酸菌のストレス応答に関するゲノム解析～耐糖性の例～、第7回日本ゲノム微生物学会年会、長浜バイオ大学、平成25年3月8日

④ 東裏典枝、波多野裕美、高見晶子、平川英樹、武部 聡、松下一信、東 慶直、病原性酢酸菌 *Asaia bogorensis* のゲノム解析、第7回日本ゲノム微生物学会年会、長浜バイオ大学、平成25年3月8日

⑤ 東 慶直、酢酸菌のストレス応答に関するゲノム解析、第7回日本ゲノム微生物学会年会、長浜バイオ大、平成25年3月8日

⑥ H. Hadano, K. Omura, H. Hirakawa, S. Takebe, K. Matsushita, Y. Azuma., Genome analysis for hyper glucose tolerance of acetic acid bacteria, *Tanticharoenia sakaeratensis* and *Asaia bogorensis*. 第3回国際酢酸菌学会 Cordoba Univ., Spain. 4/12/2012

⑦ H. Hadano, K. Omura, H. Hirakawa, S. Takebe, K. Matsushita, Y. Azuma, Genome analysis for hyper glucose tolerance of acetic acid bacteria, *Tanticharoenia sakaeratensis* and *Asaia bogorensis*.、第3回国際酢酸菌学会、Cordoba Univ., Spain、平成24年4月12日

⑧ 東 慶直、微生物のゲノム解析ー病原性菌から有用細菌まで、第9回アグリバイオ・セミナー、奈良市、平成24年3月12日

⑨ 東 慶直、産業有用微生物のストレス耐性化育種とそのゲノム情報解析、わかやまテクノゼジネスフェア、和歌山市、平成23年12月7日

[図書] (計3件)

1. 東 慶直、「遺伝子・ゲノムの構造」、p150-157、「酢の機能と科学」酢酸菌研究会編、朝倉書店

2. Y. Azuma, **Genetic instability of *Acetobacter pasteurianus* revealed by whole genome analyses** 近畿大学 生物理工学部紀要

[産業財産権]

出願状況 (計1件)

名称：融合微生物及びその融合微生物を用いた発酵産物の製造方法

発明者：東 慶直、波多野 裕美

権利者：学校法人近畿大学

種類：特願

番号：2013-000843

出願年月日：平成25年1月8日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 慶直 (AZUMA YOSHINAO)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：90333509

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し