

*Tanticharoenia sakaeratensis*の高濃度グルコース耐性・代謝に関する

プロテオーム解析

波多野 裕美¹、 武部 聡²、 東 慶直²

要旨

酢酸菌は α -proteobacteria に属する細菌群で、自然界では果物や花の蜜など糖が蓄積する環境に広く分布する。多くの酢酸菌は、高い糖代謝能を有するとともに、エタノール発酵を行う酵母と共棲し、エタノールから酢酸を生成することをその特徴とする。世界各地の食酢醸造槽からも主要発酵菌として分離されている。多くの酢酸菌は比較的高いグルコース濃度下で増殖していくことが可能である。その中でも 2002 年に Yukphan らによりタイで単離された *Tanticharoenia sakaeratensis* は、30%グルコース下でも増殖可能な酢酸菌である(1)。高濃度グルコース環境下では高浸透圧及び代謝阻害が生じ、一般的には増殖は困難である。我々は *T. sakaeratensis* のゲノム解析とプロテオーム解析により、*T. sakaeratensis* が有する 30%グルコース下での増殖を可能とする機構および遺伝子を明らかにすることを目標とした。*T. sakaeratensis* のゲノム解析にはイルミナ社の次世代シーケンサーを用い、ドラフト配列から全遺伝子を決定した。プロテオーム解析には、*T. sakaeratensis* を 0.5%および 30%グルコースを含む培地での培養後、タンパク質を可溶性画分、細胞膜結合画分、および不溶性画分に画分し、一次元および二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。0.5%と 30%グルコース環境下で蓄積量の異なるタンパク質の N 末アミノ酸配列を決定した。その結果、30%グルコース下ではピルビン酸脱炭酸酵素の蓄積量の増加や外膜タンパク質の蓄積量の減少が確認された。ピルビン酸脱炭酸酵素は高濃度グルコース環境下で過剰に作り出されたピルビン酸を、アセトアルデヒドを経て酢酸にする経路で機能すると考えられる。つまり、ピルビン酸脱炭酸酵素は *T. sakaeratensis* の高濃度グルコース環境下での増殖に深く関与することが示唆される。

1. 緒論

酢酸菌科細菌はアジアやヨーロッパにおける醸造酢(米酢やバルサミコ酢など)の発酵槽からその主要な発酵菌として分離され、その名前(酢酸菌)の由来となっている。近年、果実や花、土壌からの新種の酢酸菌の分離同定が進んでいる。それら新規の酢酸菌は伝統的な種の分類方法に加え、16S リボソーム RNA 遺伝子の DNA 配列解析に基づき分類がなされている。既存の酢酸菌科(Acetobacteraceae)細菌は、現在 28 属 417 種に分類されている(平成 23 年 6 月 25 日 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>) (図 1)。

酢酸菌は、自然界では糖が豊富に存在する果実や花を棲息域とし、酵母などと共棲し広く分布している(2)。昆虫の腸管などからも分離され、花や果実間での伝搬・分布に寄与すると考えられる(3)。また、カカオ発酵中の土壌や果樹の周辺の土壌などからは多くの酢酸菌が分離される。一方、果実と無関係な土壌や水環境からも酢酸菌が分離され、報告されている。例えば、鉱山付近の重金属濃度の高い酸性のため池な

原稿受付 2011 年 6 月 27 日

1. 近畿大学生物理工学部 生物理工学研究科 生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学生物理工学部 食品安全工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

どから分離された *Acidiphilium* 属細菌などは炭酸固定する酢酸菌として報告された(4)。また、病原性を有する酢酸菌は極めて稀だが、ヒトの肉芽腫から分離された *Granulibacter bethesdensis* は肉芽腫の原因菌として報告されている(5)。

酢酸菌はグラム陰性菌で外膜と内膜の二重の生体膜をもち、その外膜と内膜の間のペリプラズム空間に多種多様な糖やアルコールを好氣的に発酵する酵素群を有する。特に、酢酸醸造に使用される酢酸菌は、エタノールを基質として酢酸を合成する好気発酵能を有する。酢酸菌の多くは、アルコールや酢酸に対する高い耐性を示し、多様な有用二次代謝産物の生産、バイオポリマー生成など非常に多彩でかつ有用な特徴を有する(6,7)。酢酸菌は広く食酢やカカオ、ナタデココなど伝統的な発酵食品に利用され、さらにビタミンCの前駆体となるソルボースやジヒドロキシアセトンの発酵工業にも用いられている(8)。近年分離された酢酸菌には、重金属の蓄積や高濃度のグルコースの代謝など、産業的に利用の見込める形質を有するものが少なくない(1,9)。

酢酸菌の有用形質の解析としては、食酢醸造における安定的な発酵技術の開発や醸造工程における酢酸菌の役割の理解など応用研究はよく進んでいるが、多様な糖の代謝能や酢酸耐性能に関する遺伝子の同定や機能解析、遺伝子の発現調節などの基礎的な研究では未解決の問題は多い。浸透圧耐性菌として報告された酢酸菌である *Tanticharoenia sakaeratensis* は30%グルコース添加培地でも増殖し(1)、高濃度グルコースを代謝可能とする遺伝子群を有することが期待される。我々は、その *T. sakaeratensis* の30%グルコース環境下での増殖機構を解明し、有用形質の制御を可能とするシステムを獲得することを目的に、*T. sakaeratensis* のゲノム DNA 配列を解析するとともに、プロテオーム解析を用いて高濃度のグルコースの代謝能に関する解析を始めた。

2. 実験材料と方法

2.1. 菌株名と培養方法について

T. sakaeratensis NBRC 103193 を含む酢酸菌科細菌株(以下、酢酸菌)、*Acetobacter pasteurianus* NBRC3283、*Gluconacetobacter xylinus* NBRC 3288、*Acetobacter aceti* NBRC 14818、*Gluconacetobacter europaeus* NBRC 3261、*Asaia bogorensis* NBRC 16594 は、(独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター生物遺伝資源部門(NBRC)から入手した。酢酸菌の培養には、YPGD 培地 (1.0% Yeast extract、1.0% Polypepton、2% Glycerol、0.5% Glucose) を使用した。グルコースを除いた培地である YPG 培地 (1.0% Yeast extract、1.0% Polypepton、2% Glycerol) を用いた場合や、必要に応じて添加した試薬については、各図表の注釈に記載する。酢酸菌の液体培養には、使用する培養容器容量の 1/15 量(v/v)以下の培地を用いて、通常 30°Cで、250 rpm の通気・攪拌を行った。高塩濃度培養における陽性コントロールとなる細菌として、*Escherichia coli* JM109 と *Staphylococcus aureus* N315 を用いた。

2.2. *T. sakaeratensis*培養液の糖濃度測定

菌体が生産・分泌する多糖を含む全糖類量の測定には、広く使用されているフェノール硫酸法を用いた(10,11)。この方法では、グルコースやマンノース、ガラクトースなどの中性還元単糖の他、核酸やセルロースなどの多糖、ウロン酸やノイラミン酸などの酸性糖も検出可能で、その他にアセチルグルコサミンや

シアル酸などアミノ糖も部分的に検出可能とされている。まず、*T. sakaeratsensis* の培養液 1.0 mL から菌体を遠心分離(1,200 g、5 分間、4°C)した。その培養液上清 50 μ L と 5%フェノール 50 μ L を混合し、濃硫酸 250 μ L を加え反応させた。マイクロタイタープレートリーダー (Beckman, Fullerton, CA, USA)を用いて、褐色を呈するフルフラール誘導体量を 490 nm の波長で測定した。グルコース溶液を糖標準溶液として用い、総糖質量をグルコース当量として算出した。

2.3. *T. sakaeratsensis*の走査型電子顕微鏡観察

T. sakaeratsensis 細胞の走査型電子顕微鏡観察には、0.5%と 30%グルコースを含む YPGD 寒天培地上で増殖した菌体コロニーを培地(1 cm²)ごと切り出し、2.5%グルタルアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)1 mL 中で 1 時間固定した。その後、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)1 mL 中で 10 分間の洗浄を 6 回行った。次に 1%四酸化オスミウム/0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)1 mL 中で 30 分間固定し、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)

1 mL 中で 10 分間の洗浄を 2 回行った。脱水処理として、50%エタノール水溶液から順に 70%、80%、90%、95%のエタノール水溶液中にそれぞれ 10 分間浸漬し、最後に 99.5%エタノール水溶液中に 10 分間の浸漬を 3 回行った。次に、t-ブチルアルコールに 3 回、15 分間浸漬することによりアルコールの置換を行い、4°Cに 1 時間放置し凍結させた。この凍結試料を減圧下で凍結乾燥し、銅板上に導電性カーボンテープと銀ペーストを用いて固定した。その後、白金パラジウムを厚さ 10 nm コーティングし導電処理した。走査型電子顕微鏡 S-900(日立製作所、東京)へ試料をセットし、液体窒素で冷却し、10 kV、10,000 倍から 40,000 倍で菌体を観察した。

2.4. 細胞の分画法

T. sakaeratsensis をグルコース濃度 0.5%および 30%となる YPGD 液体培地 30 ml で培養した。それぞれの培養液の OD₅₉₅ が約 0.6 の時に、培養液から 1,200 g、5 分間、4°Cの遠心分離により、菌体を回収した。タンパク質を細胞膜との結合性の違いで分画するため、Sampling buffer C (50% 尿素、1/4×タンパク質分解酵素阻害剤カクテル(PIC)、20 mM ジチオスレイトール(DTT)、0.8% CHAPS と 2% Triton X100 を含有)と Sampling buffer M (50%尿素、0.4% CHAPS と 0.5% ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を含有)を用いた。まず、菌体に 0.5 mL の Sampling buffer C を加え、氷上で超音波破碎した。1,200 g、10 分間、4°Cの遠心分離により、上清と沈殿に分け、上清を可溶性画分(soluble fraction)とした。次に細胞膜と結合しているタンパク質を回収するために、先の沈殿に 2.0 mL の Sampling buffer M を加えた。サンプルを超音波により均一に分散し、1,200 g、10 分間、4°Cの遠心分離により、上清と沈殿に分けた。上清を膜結合画分(membrane bound fraction)として回収した。沈殿物に 4.0 mL の 1× SDS buffer (50 mM Tris-HCl (pH6.8)、100 mM DTT、1.2% SDS、0.03% ブルモフェノールブルー(BPB)と 10%グリセロールを含有)を加え、不溶性画分(pellet)として回収した。

2.5. タンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動とアミノ酸配列決定

タンパク質の2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Immobiline DryStrip (GE Healthcare、Fairfield、CT)を用いてMultiphor II 電気泳動システム(GE Healthcare)で行った。タンパク質のアミノ酸配列決定には、ABI MODEL 477Aプロテインシーケンサーを用い、エドマン分解法により各タンパク質のN末端アミノ酸配列を近畿大学共同利用センター大阪狭山分室で決定した。

2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動の試料として、soluble fraction と membrane bound fraction のそれぞれ 235 μL に、5 μL の 1 M DTT および 10 μL の IPG buffer 3-11(GE Healthcare)を混合した。そのサンプルを用いて 13 cm の Immobiline DryStrip pH 3-10 をシリコンオイルで覆い、10~15 時間、20°Cで膨潤した。等電点電気泳動は、以下の3ステップで行った、1. (300 V、2 mA、5 W、1 分間)、2. (300 V から 3,500 V のグラディエント、2 mA、6 W、1 時間 30 分)、3. (3,500 V、2 mA、5 W、20 時間)。泳動後の DryStrip は 1.0 mL の 1 \times SDS equilibration buffer (7.207g の尿素、0.4 g の SDS、6.9 mL のグリセロール、1 M Tris-HCl(pH6.8) および BPB を含有)中で平衡化した。その後、2次元目の SDS-PAGE を行った。その後、0.5 \times Transfer buffer (3.0 g の Tris base、14.3 g のグリシン、0.5 g の SDS、20%メタノールを含有)を用いて、SDS-PAGE 後のゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜を CBB staining buffer (0.25% Coomassie brilliant blue R250、40%メタノール)で染色し、脱色用 buffer (50%メタノール、10%酢酸)で脱色した。アミノ酸を同定するための染色スポットを切り出した後、脱色用 buffer (50% methanol、10% acetic acid)で完全に脱色し、水洗した。

2.6. 遺伝子情報解析と代謝マップ解析

決定したアミノ酸配列はBLAST検索により類似するタンパク質を同定し、機能の予測を行った。共同研究を進める京都大学化学研究所の金久 實教授および五斗 進准教授の開発した KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)ならびに「細胞機能と代謝マップ I. 細胞の代謝・物質の動態」(日本生化学会編、東京化学同人)、酢酸菌の代謝を報告した論文(10)を参考にして、アミノ酸配列から予測される *T. sakaeratensis* のタンパク質の機能を代謝マップに位置づけた。

3. 結果

3.1. *Tanticharoenia sakaeratensis* 分子系統解析

T. sakaeratensis の 16S リボソーム RNA 遺伝子の DNA 配列を他の酢酸菌の DNA 配列と比較解析し、酢酸菌群の分子系統解析を行った (図 1)。*T. sakaeratensis* は比較的 *Gluconobacter* 属の近傍に位置した。

3.2. 高濃度グルコース環境下における *T. sakaeratensis* の増殖

Yukphan らによると、*T. sakaeratensis* は他の酢酸菌が増殖できない 30%グルコース下で増殖可能な高浸透圧耐性菌で、褐色の色素を産生する(1)。当研究室の環境でも、*T. sakaeratensis* は 30%グルコース下で増殖し、分泌性で水溶性の褐色色素を産生した(図 2A)。酢酸菌科細菌である *Acetobacter aceti*、*Asaia bogorensis*、*Gluconacetobacter europaeus* は 30%グルコース下での増殖は観察されなかった。一方、*T. sakaeratensis* は 1% NaCl (0.17 M)で部分的に増殖可能であるが、2% NaCl では増殖しなかった(図 2B)。実験に用いたいずれの酢酸菌も 2% NaCl (0.34 M)では増殖できず、これら酢酸菌は浸透圧もしくは NaCl に極めて感受性であることが分かった。7.5%の塩濃度でも増殖が可能な耐塩性細菌 *Staphylococcus aureus* および 4%の NaCl 濃度で

増殖が困難となる非耐塩性細菌 *Escherichia coli* を陽性コントロールとした。

酢酸菌はその内膜と外膜の間のペリプラズム空間で多様な糖やアルコールを酸化発酵することを特徴としている。高濃度グルコース下での培養中に *T. sakaeratensis* が培地中のグルコースを代謝するのか検討するために、*T. sakaeratensis* を 30%グルコース YPGD 液体培地で培養し、培養上清中に含まれる糖濃度および pH の測定した。*T. sakaeratensis* の増殖が進むにつれ、糖濃度および pH は低下することが分かった(図 2C)。この時、遠心分離により回収された菌体に含まれる菌体当たりの総糖量は、増殖フェーズや 0.5%グルコース環境下での培養と比較しても、有意差はなかった(データは割愛)。また、*T. sakaeratensis* の形態は 0.5%グルコース濃度下では、30%グルコース環境での菌の形態と比較すると、部分的に長くなり先端が鋭形になる傾向があるが、0.5%と 30%グルコース濃度環境下では顕著な差は見られなかった(図 2D)。つまり、培養液上清における糖濃度の減少は、*T. sakaeratensis* がグルコースを菌体内に取り込むためではなく、多くの酢酸菌と同様にグルコースを菌体外(細胞膜上)で代謝することによると考えられる。そこで、*T. sakaeratensis* のグルコース消費速度を計算したところ、30%グルコース環境では最初の 24 時間(対数増殖初期)は 10.8 から 12.6 mg glucose/OD595/hour/ml で、その後 48 時間では 1.0 mg glucose/OD595/hour/ml であった。また、0.5%グルコースの培地では、対数増殖初期は 4.5 mg glucose/OD595/hour/ml で、後期には 1.1 mg glucose/OD595/hour/ml となる(表 1)。高濃度グルコースに適応する初期に、定常期と比較するとグルコース代謝が 10 倍くらい活発であることが明らかとなった。

3.3. 異なるグルコース濃度環境下で培養した *T. sakaeratensis* のタンパク質の分析

T. sakaeratensis は 30%グルコース環境下においてグルコースを代謝しているとした場合に、0.5%グルコース環境と 30%グルコース環境では同じグルコース代謝系が使用されるのか、それとも、30%グルコース環境に暴露した際に特殊な代謝系が発現するのか不明である。そこでまず、*T. sakaeratensis* が異なる濃度のグルコースに暴露した際に、適応期間を必要とするかどうか検討するために、0.5%グルコース培地での増殖を繰り返した菌を、異なるグルコース濃度の培地に接種し、その増殖を観察した(図 3A)。グルコース濃度が高くなるにつれ、その環境に適応するまでの期間(ラグタイム)が長くなる傾向があり、また、初期の増殖速度も低くなる。これは、0.5%グルコース培地から 30%グルコース培地への環境変化への適応にある種、例えば細胞膜上に存在する高濃度グルコースを至適反応濃度とするグルコース脱水素酵素遺伝子などの発現変化が起きていることを示唆する。

異なるグルコース濃度環境下におけるタンパク質蓄積量の変化、つまり遺伝子発現量の変化を調べるため、それぞれのグルコース濃度の培地での培養液から OD595 がおよそ 0.5 から 1.0 に菌体を回収し、SDS-PAGE によりタンパク質プロファイルと比較した(図 3B)。このとき、30%グルコース環境への適応が一種の増殖停止期(ステイショナリーフェーズ)への移行と区別されるか検討するため、0.5%グルコース培地での培養における対数増殖期(ログフェーズ)前期と後期、増殖停止期初期の菌体を用意した。結果として、0.5%グルコースにおける増殖の各フェーズでのタンパク質の蓄積量と、グルコース濃度 0.5%、10% および 20%環境下での *T. sakaeratensis* のタンパク質の蓄積量は極めて類似していた。しかし、30%グルコース濃度環境下でのタンパク質プロファイルには、特に分子量 50,000 周辺では顕著な違いを確認することができた(図 3B、異なる条件での SDS-PAGE のデータは示さず)。

30%グルコース濃度環境への適応が細胞外（細胞膜上）の酵素に依存していると仮定すると、細胞膜および膜結合タンパク質の解析を必要とする。そこで、0.5%および30%グルコースの培地にて培養した *T. sakaeratensis* の菌体を超音波により破碎し、可溶性画分(soluble fraction)、膜結合画分(membrane bound fraction)、および不溶画分(pellet)の3つにタンパク質を分画し、SDS-PAGEにより比較解析した(図3 C)。30%グルコースで培養した菌体にだけ存在するタンパク質が、可溶性画分の20 kDa以下のところと、膜結合画分で25kDaの位置で確認された。逆に、不溶性画分では43kDa前後および20kDaの位置にグルコース濃度0.5%で培養した菌体にのみ存在するタンパク質が確認された。

3.4. グルコース濃度により蓄積が異なるタンパク質の機能予測

0.5%および30%グルコース濃度環境下で培養を行った *T. sakaeratensis* から調製した可溶性画分、膜結合画分、不溶画分のタンパク質プロファイルを一次元電気泳動と二次元電気泳動を用いて比較し(図3 C、二次元電気泳動のデータは割愛)、グルコース濃度により蓄積量の異なるタンパク質について、そのN末アミノ酸配列を決定した。その配列データをBLAST検索にかけることにより類似するタンパク質の同定を行った。

30%グルコース濃度環境下で蓄積する約70 kDaと50 kDaのタンパク質から、NH₂-MFNYRKEIM-COOHとNH₂-MSKDVKFGAAWQRM-COOH、NH₂-MYTVGTYLAERL-COOHの配列を得た。それぞれ、*Gluconacetobacter diazotrophicus* の polynucleotidephosphorylase、*Zymomonas mobilis* の pyruvate decarboxylase に類似する。0.5%グルコース濃度環境下で蓄積する36 kDaのタンパク質から、NH₂-STITGPYVDLGGGYN-COOH配列を得て、*Acetobacter pasteurianus* の OmpA タンパク質と類似することが分かった。*G. diazotrophicus* と *A. pasteurianus* は酢酸菌科細菌で、*Z. mobilis* は酢酸菌と同様α-プロテオバクテリアに属する。

4. 考察

酢酸菌科(Acetobacteraceae)細菌は現在416種が28属に分類されている。伝統的分類である酢酸菌(Acetic acid bacteria)は酢酸菌科(Acetobacteraceae)に含まれる12属202種を指すことが多い(1)。その12番目の新属として登録されたのが *T. sakaeratensis* であり、新属とすべきか、*Gluconobacter* 属の新種とするべきか議論がある。*T. sakaeratensis* のゲノムDNA配列は現在、我々のグループが中心になって解析を進めており、体系的な分子系統解析からその分類が確立することが期待される。

T. sakaeratensis は浸透圧耐性を特徴とすると考えられた。30%グルコースを含む培地で増殖可能で、培地の他の溶質も加味して単純に浸透圧を計算すると5.0 MPaになる。同様の浸透圧をNaClで得る場合、およそ10%NaClとなり、7.5%のNaCl濃度でも増殖が可能な耐塩性細菌 *Staphylococcus aureus* よりも高塩濃度の培地で増殖可能となることが期待される。しかし、実際には1% NaClを含む培地でさえその増殖は極端に抑制されることから、*T. sakaeratensis* の有する耐浸透圧耐性は特殊な溶質に限定される浸透圧耐性であると考えられる。もしくは、NaClに極めて感受性が高いのかも知れない。

T. sakaeratensis の30%グルコース環境下での最初の24時間のグルコース消費速度は、12 mg glucose/OD595/hour/mlで、大腸菌を0.2%グルコース培地でジャーファンメーターを用いて効率よく培養し

た際の糖消費速度は約 10 mg glucose/OD595/hour/ml と同程度であった(12)。つまり、*T. sakaeratensis* は 30% グルコースを含む培地では、培養初期に高濃度のグルコースを効率よく代謝する酵素（群）が発現していると考えられる。また、*T. sakaeratensis* は、グルコースから 2-ケトグルコン酸を生産するが、エタノールから酢酸は生産しないとされている。30%グルコースで培養した場合、pH が 2.5 程度まで低下することを考えると、最終的には酢酸を生産していると考えられる。一般に酢酸菌の培養では、培地中の糖が有機酸に変化した後、その有機酸を代謝し始める期間に、一時的に増殖が停止する。図 3 A の 30 時間前後に見られる OD595 の減少と増加は、同様の二段階増殖であると考えられる。今後メタボローム解析により、生産される有機酸について明らかにしたい。

酢酸菌は、内膜に結合しペリプラズム層で機能する様々な酸化還元酵素を有し、多種多様な糖やアルコールなどの酸化発酵を行う。この反応には、PQQを補酵素とするキノプロテイン(PQQ酵素)とFAD を補酵素とするフラボプロテイン(FAD酵素)がある(13)。それら酵素の半数くらいはチトクロームCをサブユニットとする。酸化発酵で得られる還元力は、チトクロームCもしくは同様に内膜に位置する酸化的リン酸化のユビキノール（酢酸菌では種によってQ9もしくはQ10が使用される）を還元し、スカラー反応のエネルギーフォースになると考えられている。

膜成分を多く含むと考えられる不溶性画分には30%グルコース環境で蓄積量が激減するタンパク質が観察された。その1つが、OmpAタンパク質であった。OmpAタンパク質は通常、外膜を貫通するドメインとペリプラズムドメインからなる。高濃度グルコース環境下では、低浸透圧環境下で物質の輸送や情報伝達を担っていたOmpAタンパク質が、環境適応の一つとして減少したと推察された(14,15)。酸化発酵の酵素が同定されなかったのは、それらが膜結合タンパク質として分画されたことが一因と考えられる。酢酸菌では一般に、細胞内に取り込まれたグルコースは、解糖系からペントースリン酸回路を経由してピルビン酸に代謝された後、アセチルCoAに代謝され、TCA回路におけるエネルギー代謝に使用される。ゲノム配列既知の酢酸菌ではpyruvate decarboxylase遺伝子を有する菌は少ないが、pyruvate decarboxylaseはピルビン酸をアセトアルデヒドに代謝する酵素であり、最終的にはアセトアルデヒドは酢酸や二酸化炭素に代謝される（図3D）(16)。つまり、*T. sakaeratensis*のpyruvate decarboxylaseは、高濃度のグルコースの代謝により生じた過剰なピルビン酸を酢酸へ代謝し、高濃度グルコース環境に適応するための一つの手段となっていることが示唆される。

本研究結果のタンパク質の分画では、膜結合タンパク質分画に30%グルコース培養の菌体に蓄積するタンパク質が多く確認され、それらタンパク質には高濃度のグルコースを代謝するための酵素が含まれると考えられる。しかし、それらの同定にはまだ至っておらず、今後、ゲノムDNA配列解析に基づく網羅的なプロテオーム解析が必要である。

5. 謝辞

タイ国 BIOTEC Culture Collection の山田雄三博士には *T. sakaeratensis* の解析に関して、山口大学農学部の松下一信教授には酢酸菌の取扱いなどに関して、近畿大学共同利用センター大阪狭山分室の本田映子氏と堀内喜高氏にはアミノ酸配列解析と電子顕微鏡観察において、ご助言など頂き感謝いたします。

6. 参考文献

1. Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Potacharoen, W. and Yamada, Y. (2008) *Tanticharoenia sakaeratensis* gen. nov., sp. nov., a new osmotolerant acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **72**, 672-676.
2. Yamada, Y. and Yukphan, P. (2008) Genera and species in acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, **125**, 15-24.
3. Ryu, J.H., Kim, S.H., Lee, H.Y., Bai, J.Y., Nam, Y.D., Bae, J.W., Lee, D.G., Shin, S.C., Ha, E.M. and Lee, W.J. (2008) Innate immune homeostasis by the homeobox gene *caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science*. **319**, 777-782.
4. Kusel, K., Dorsch, T., Acker, G. and Stackebrandt, E. (1999) Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3633-3640.
5. Greenberg, D.E., Porcella, S.F., Stock, F., Wong, A., Conville, P.S., Murray, P.R., Holland, S.M. and Zelazny, A.M. (2006) *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family Acetobacteraceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56**, 2609-2616.
6. Saito, K., Yajima, T., Nishimura, H., Aiba, K., Ishimitsu, R., Matsuguchi, T., Fushimi, T., Ohshima, Y., Tsukamoto, Y. and Yoshikai, Y. (2003) Soluble branched beta-(1,4) glucans from *Acetobacter* species show strong activities to induce interleukin-12 in vitro and inhibit T-helper 2 cellular response with immunoglobulin E production in vivo. *J. Biol. Chem.*, **278**, 38571-38578.
7. Yadav, V., Paniliatis, B.J., Shi, H., Lee, K., Cebe, P. and Kaplan, D.L. (2010) Novel in vivo-degradable cellulose-chitin copolymer from metabolically engineered *Gluconacetobacter xylinus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 6257-6265.
8. Adachi, O., Moonmangmee, D., Toyama, H., Yamada, M., Shinagawa, E. and Matsushita, K. (2003) New developments in oxidative fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 643-653.
9. Kimura, S., Hallberg, K.B. and Johnson, D.B. (2006) Sulfidogenesis in low pH (3.8-4.2) media by a mixed population of acidophilic bacteria. *Biodegradation*. **17**, 159-167.
10. Azuma, Y., Hosoyama, A., Matsutani, M., Furuya, N., Horikawa, H., Harada, T., Hirakawa, H., Kuhara, S., Matsushita, K., Fujita, N. *et al.* (2009) Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5768-5783.
11. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1951) A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*. **168**, 167.
12. Glazyrina, J., Materne, E.M., Dreher, T., Storm, D., Junne, S., Adams, T., Greller, G. and Neubauer, P. (2010) High cell density cultivation and recombinant protein production with *Escherichia coli* in a rocking-motion-type bioreactor. *Microbial cell factories*. **9**, 42.
13. Ano, Y., Toyama, H., Adachi, O. and Matsushita, K. (2008) Energy metabolism of a unique acetic acid bacterium, *Asaia bogorensis*, that lacks ethanol oxidation activity. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **72**, 989-997.
14. Pautsch, A. and Schulz, G.E. (2000) High-resolution structure of the OmpA membrane domain. *J. Mol. Biol.*, **298**, 273-282.
15. Iida, A., Ohnishi, Y. and 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.
16. Chandra Raj, K., Ingram, L.O. and Maupin-Furlow, J.A. (2001) Pyruvate decarboxylase: a key enzyme for the oxidative metabolism of lactic acid by *Acetobacter pasteurianus*. *Arch. Microbiol.*, **176**, 443-451.

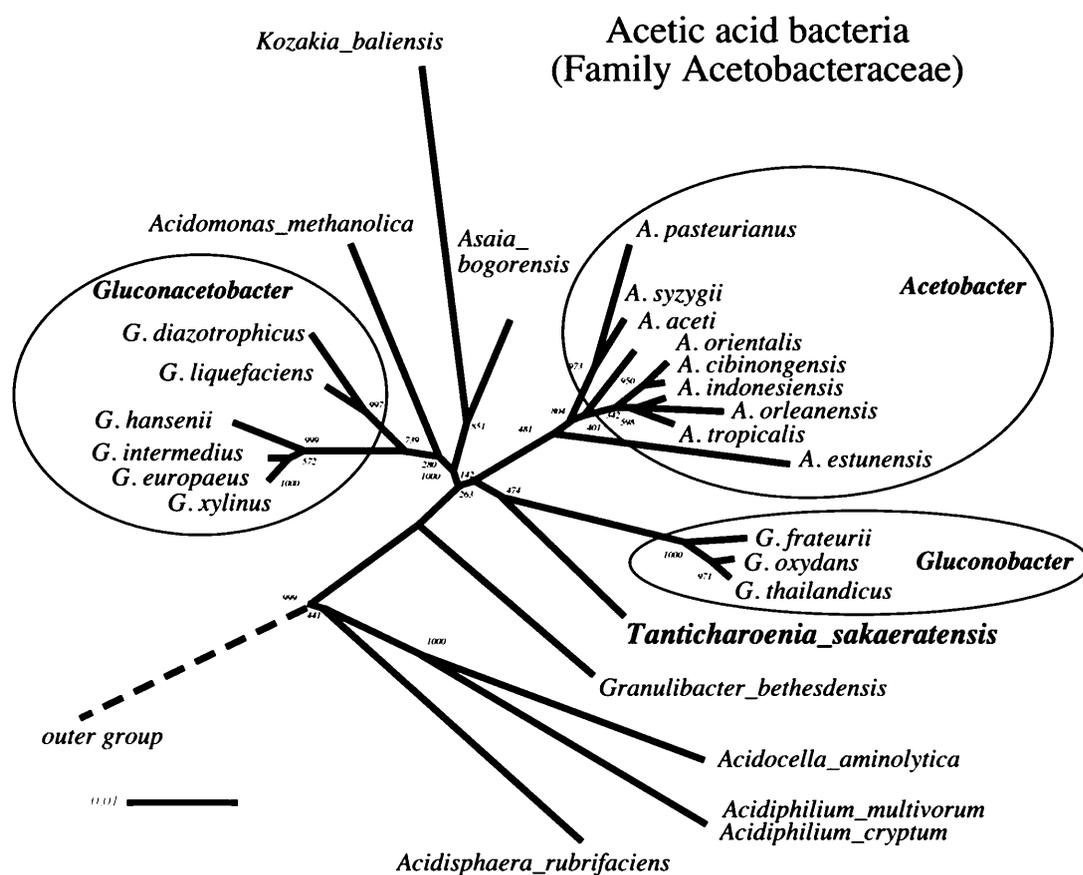


図1 16S リボソーム RNA の配列に基づく酢酸菌の分子系統図。
酢酸菌科(Acetobacteraceae)細菌は現在 416 種が 28 属に分類されている。(平成 23 年 6 月 25 日)

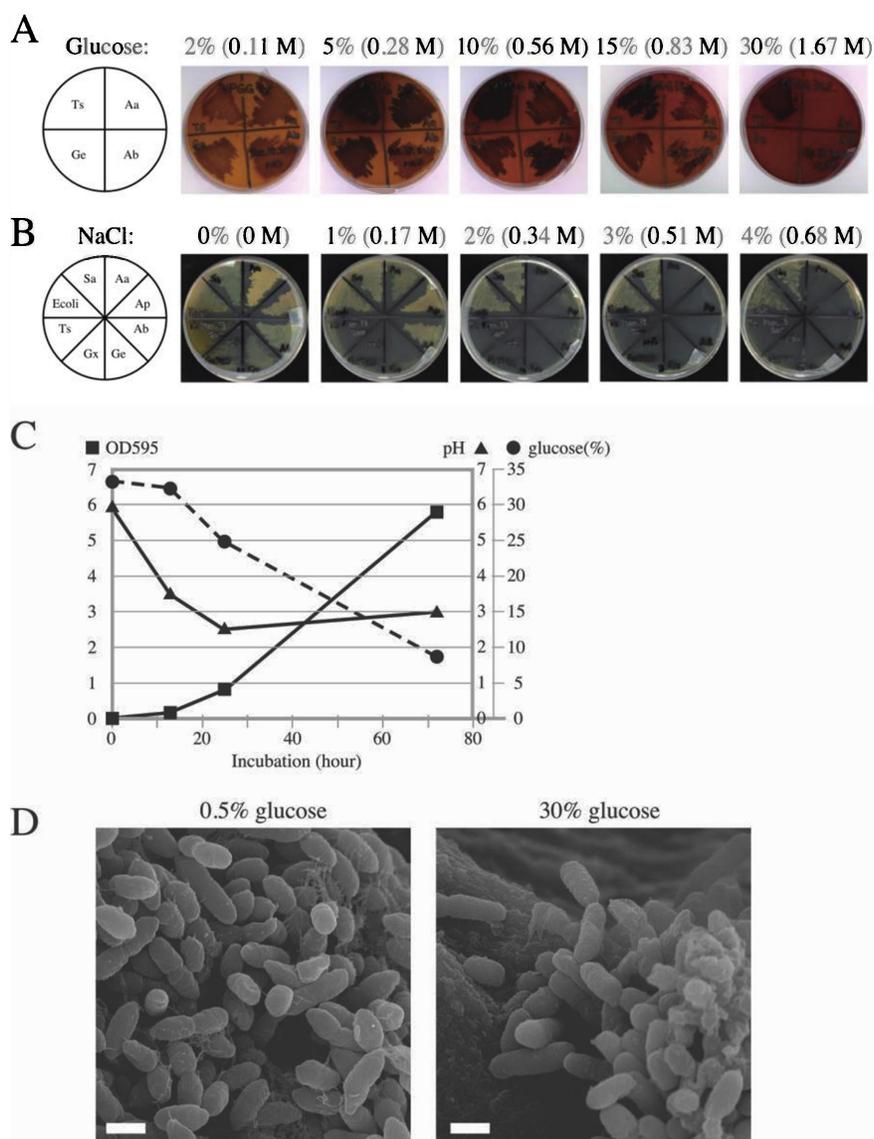


図2 異なるグルコース濃度と NaCl 濃度環境下での酢酸菌などの増殖。

A) 異なるグルコース濃度環境下での *T. sakaeratensis* の増殖。B) 異なる NaCl 濃度環境下での *T. sakaeratensis* の増殖。各写真の上に濃度パーセンテージ(w/v)と括弧内にモル濃度を示す。C) 30%グルコースを含む YPGD 液体培地での培養での培養液中のグルコース濃度および pH。■: 培養液の OD、▲: pH、●: 総糖濃度。D) *T. sakaeratensis* 菌の走査型電子顕微鏡による観察。0.5%と 30%グルコースを含む YPGD 寒天培地上で増殖した菌体を、走査型電子顕微鏡 S-900(日立製作所)を用いて、10,000 倍で観察した。図中の白棒の長さは 1 μm を示す。菌種名の略号は、それぞれ Aa: *Acetobacter aceti*、Ap: *Acetobacter pasteurianus*、Ab: *Asaia bogorensis*、Ge: *Gluconacetobacter europaeus*、Gx3288: *Gluconacetobacter xylinus* NBRC3288、Ts: *T. sakaeratensis*、E.coli: *Escherichia coli*、Sa: *Staphylococcus aureus*、Am: *Acidomonas methanolica*、Gx13693: *Gluconacetobacter xylinus* NBRC13693。

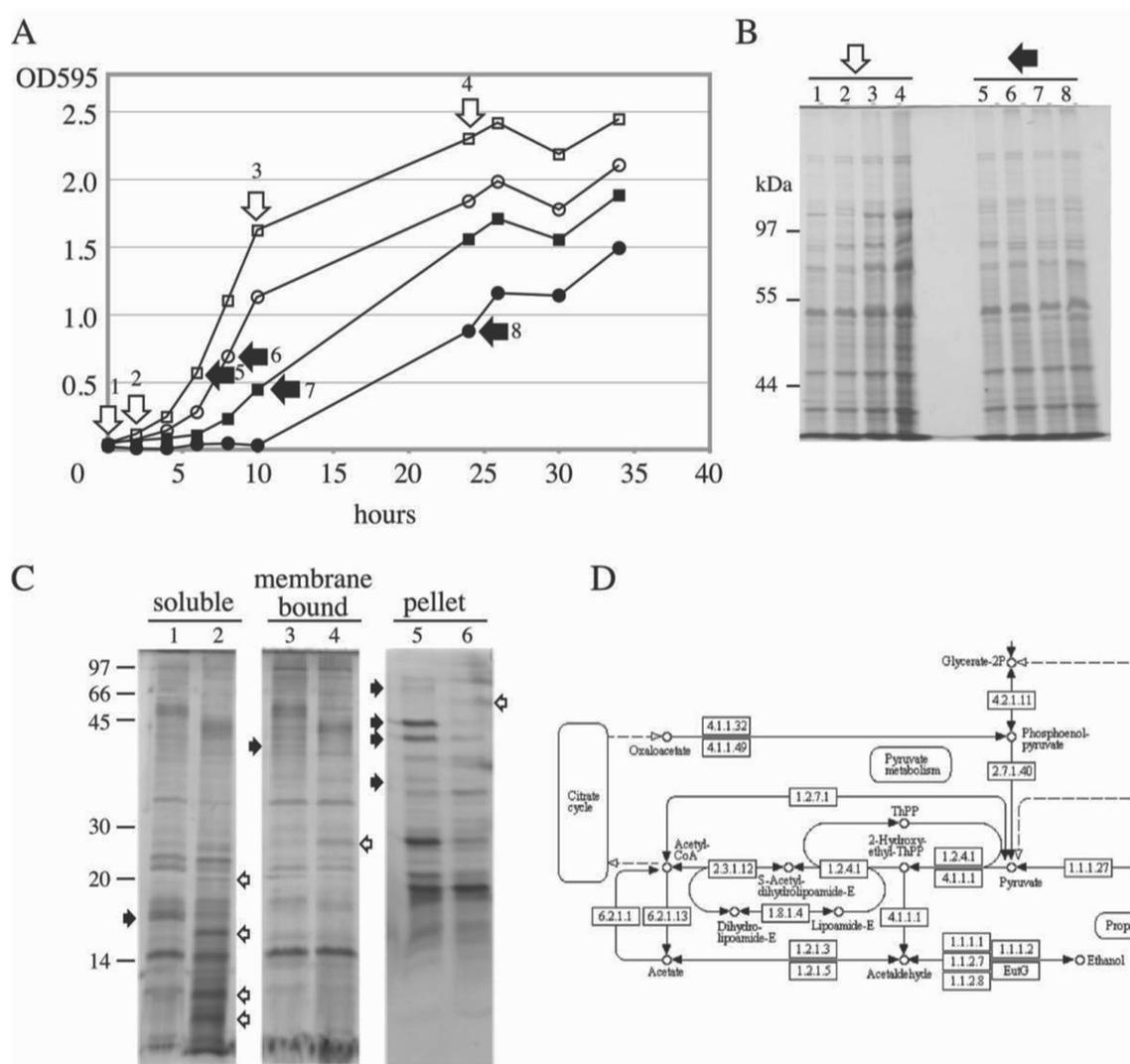


図3 異なるグルコース濃度環境下における *T. sakaeratis* のタンパク質プロファイル

A)異なるグルコース濃度環境下での *T. sakaeratis* の増殖。図中の記号 (□: 0.5%、○: 10%、■: 20%、●: 30%) はグルコース濃度を示す。矢印は菌体を回収したタイミングを示す。B)グルコース濃度ごとのタンパク質解析。レーン1~4 (レーン1:0時間、2:4時間、3:10時間、4:24時間) はグルコース濃度0.5%環境下での異なる増殖フェーズで、レーン5~8 (レーン5:0.5%、6:10%、7:20%、8:30%) は異なるグルコース濃度環境下での培養に由来するタンパク質。7.5%アクリルアミド SDS-PAGE で分析した。C) タンパク質の分画。グルコース濃度0.5%および30%環境下で培養した *T. sakaeratis* をそれぞれ soluble fraction、membrane bound fraction および pellet の3つのタンパク質に分画し、SDS-PAGEによりタンパク質解析を行った。それぞれ、レーン1, 3, 5:グルコース0.5%、2, 4, 6:グルコース30%。黒色と白色の矢印はそれぞれ0.5%と30%のグルコース添加培地でのみ確認されるタンパク質を示す。D)解糖系のピルビン酸からアセトアルデヒドと酢酸を経てアセチル CoA と TCA 回路に至る代謝経路。EC4.1.1.1 が pyruvate decarboxylase。

表1 *T. sakaeratensis* の培養に伴う培養液上清中の糖度の変化と糖度変化速度

30% glucose 培地							0.5% glucose 培地						
時間	培養液濁度	培養液糖度	期間	のべ菌数	糖減少量	減少量/菌数	時間	培養液濁度	培養液糖度	期間	のべ菌数	糖減少量	減少量/菌数
hours	OD595	Glucose(%)	(hours)	ODxhours	mg/ml	mg/ml/OD/hours	hours	OD595	Glucose(%)	(hours)	ODxhours	mg/ml	mg/ml/OD/hours
0	0.00	33.3	-	-	-	-	0	0.00	0.59	-	-	-	-
13	0.14	32.3	0 - 13	0.94	10.1	10.8	4	0.13	0.47	0 - 4	0.26	1.2	4.5
25	0.84	24.8	13 - 25	5.92	74.7	12.6	9	0.73	0.24	4 - 9	2.16	2.3	1.1
72	5.80	9.1	25 - 72	156.1	156.6	1.0	24	2.50	0.99	9 - 24	24.26	-7.5	-0.3

英文抄録

Proteome analysis of hyper glucose tolerance and metabolism of an acetic acid bacterium, *Tanticharoenia sakaeratensis*.Hiromi Hadano¹, So Takebe², Yoshinao Azuma²

Acetic acid bacteria (AAB), forming a divergent phylogenetic group within the alpha-proteobacteria, distribute in wide range of niches where sugar is accumulated, e.g. fruits, flower nectar and soils nearby in nature. AAB strains are phenotypically characterized with regard to their abilities to utilize a variety of carbon sources including ethanol, carbohydrates, organic acids and glycerol, and the most well-known feature of AAB is the oxidation of ethanol to acetic acid. Due to the economic importance in the productions of vinegar and other biochemical usefulness, isolation of AAB has been extensively carried out with numerous types of media containing suitable carbon sources (e.g. glucose, ethanol and mannitol), nitrogen sources and vitamins, and acetic acid for selection. *T. sakaeratensis*, which was isolated as a new species of AAB from soil in Thailand, is characterized by tolerance of high glucose concentration up to 30% D-glucose (1). To clarify mechanisms of the *T. sakaeratensis* responding and overcoming the osmotic and metabolic stress from high glucose concentration, we have been performing comparative genome and proteome analyses. For the comparative proteome analysis, *T. sakaeratensis* was grown in two media containing 0.5% and 30% glucose, proteins from the cells were fractionated into soluble, membrane-bound and SDS-mediated extractants, and analyzed by 1D and 2D gel electrophoresis. Comparison of protein profiles and amino acid sequencing indicates that accumulation of several gene products were regulated by the glucose concentration, e.g. one gene product involved in a pyruvate metabolism was accumulated and outer membrane proteins were decreased in the 30% glucose condition.

1 Department of Biotechnological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2 Department of Biotechnological Science, School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan