

代謝改変酢酸菌を利用した機能性食酢の開発

赤坂 直紀

関西学院大学審査 博士学位論文

2015年3月

目次

第 1 章	序論	1
第 2 章	分岐鎖アミノ酸高生産株のスクリーニング及び特性	19
第 3 章	ウラシル要求性を指標とした遺伝子破壊技術の構築	38
第 4 章	潜在型プラスミドを利用した遺伝子改変技術の構築	66
第 5 章	分岐鎖アミノ酸生産能を付与する基盤技術の構築	98
第 6 章	代謝改変酢酸菌を用いたショウジョウバエ誘引素材の開発	126
第 7 章	総括と展望	151
	本論文に関する報告	157
	謝辞	158

略語一覽

5-FOA	5-fluoroorotic acid
5-FOMP	5-fluoroorotidine-5'-monophosphate
5-FUMP	5-fluorouridine-5'-monophosphate
ABA	α -aminobutyric acid
ADH	Alcohol dehydrogenase
AHAIR	Acetohydroxyacid isomeroeductase
AHAS	Acetohydroxyacid synthase
ALDC	α -acetolactate decarboxylase
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
ALS	α -acetolactate synthase
AMPK	5'-AMP-activated protein kinase
AT	Aminotransferase
BC	Bacterial cellulose
BCAA	Branched-chain amino acid
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane
<i>cs</i>	Citrate synthase
DHAD	Dihydroxyacid dehydratase
DIG	Digoxigenin
DR	Diacetyl reductase
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
<i>fah</i>	Fumarylacetoacetate hydroxylase
<i>fum</i>	Fumarase
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
GC	Gas chromatography

GC-EAD	Gas chromatography coupled with electroantennographic detection
<i>gr</i>	Glutamate racemase
<i>gt</i>	Glycosyltransferase
HPLC	High performance liquid chromatography
HTH	Helix-turn-helix
IPMD	3-isopropylmalate dehydratase
IPMDH	3-isopropylmalate dehydrogenase
IPMS	2-isopropylmalate synthase
Kid	Killing-determinant protein
Kis	Killing-suppressor of Kid
LDH	Lactate dehydrogenase
Lrp	Leucine responsive regulatory protein
<i>mct</i>	Metallic cation transporter
Mob	Mobilization protein
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NTG	<i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine
OAA	Oxaloacetate
OD	Optical density
OMP	Orotidine-5'-monophosphate
OMPdecase	Orotidine-5'-monophosphate decarboxylase
OPRTase	Orotate phosphoribosyltransferase
ORF	Open reading frame
PCN	Plasmid copy number
PDC	Pyruvate decarboxylase
PEP	Phosphoenolpyruvate

PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PPi	Pyrophosphate
PQQ	Pyrroloquinoline quinone
PRPP	5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate
PSK system	Post-segregational killing system
qRT-PCR	Quantitative reverse-transcription PCR
Rep	Replication initiator protein
SD	Shine-Dalgarno sequence
SREBP-1	Sterol-regulatory element binding protein-1
SWD	Spotted-wing drosophila
TD	Threonine deaminase
TLC	Thin layer chromatography
<i>tr</i>	Thioredoxin reductase
UCP	Uncoupling protein
UMP	Uridine-5'-monophosphate
YPD broth	Yeast-peptone-dextrose broth

第1章 序論

酢酸菌の研究動向

酢酸菌はグラム陰性かつ偏性好気性の真正細菌であり、分類学上アルファプロテオバクテリアに属する(1, 2). 慣習的に、古くから食酢製造に用いられてきた微生物であるため、酵母や乳酸菌同様、食生活と密接に関連した、ヒトにとって非常に身近な微生物の一つと言える。食酢製造においては、*Acetobacter* 属及び *Komagataeibacter* 属酢酸菌が広く用いられている(3). 一般に自然界では、花、果実、或は腐敗果実に生息しており、それらに含まれる糖や糖アルコールを利用する事で生育すると共に、酵母及び乳酸菌と共生関係を構築している(4). 自然発酵食品中においても、これら3種の微生物の共生関係がしばしば見受けられる。例えば、カカオ豆醸成にも酵母、乳酸菌、及び酢酸菌が関与しており、これら微生物由来の様々な代謝産物(有機酸等)が最終製品の香味や品質を決定付ける(5, 6). また、アルファプロテオバクテリアに属する酢酸菌近縁種には、リケッチア属(7)に代表される、動植物と共生、或は寄生関係を築くものが多い。ある種の酢酸菌はショウジョウバエやミツバチ等昆虫の腸管内で共生しており(8, 9), それら酢酸菌の代謝産物が宿主の様々な生理機能に大きな影響を与える事が近年の解析から明らかにされ(10), 酢酸菌は食品製造とは異なる観点からも注目を集めている。

酢酸菌研究の歴史は古く、近代微生物学の礎を築いたパストゥールの発見に端を発する(11). 酢酸菌を特徴付ける最も特異な代謝機構として、細胞膜結合型脱水素酵素によるアルコール・糖・糖アルコールの、それぞれに対応する有機酸への酸化と、それら有機酸の外部環境中への蓄積が挙げられる。生産された有機酸は、多くの場合二酸化炭素まで酸化される事なく環境中に残存するため、酢酸菌によるこれら代謝は「不完全酸化」と呼ばれる。食酢醸造は、酢酸菌による、エタノールの酢酸への酸化を利用したものであるが、外部環境中に存在する炭素源を直接的に酸化するという、他の微生物ではあまり見られない代謝の特異性から、この代謝反応を担う細胞膜結合型

脱水素酵素の、生化学的・酵素学的解析が長らく集中的に行われてきた。現在では、酢酸菌が細胞質及び細胞膜に、それぞれ NAD(又は NADP)依存型、及びピロロキノリンキノン(pyrroloquinoline quinone, PQQ)依存型脱水素酵素を持ち、後者が食酢醸造に代表される不完全酸化を行う事は比較的によく知られているが、1960年代に中山らの先駆的研究により、NAD(又は NADP)を補酵素としない脱水素酵素の存在が初めて明らかにされた(12-14)。また、朝井らの種々の酢酸菌を対象とした包括的研究により、膜酵素による酸化のみにとどまらない、酢酸菌の中核代謝や形態学的特性の一端が明らかにされ、酢酸菌研究黎明期における研究基盤が確立された(15, 16)。以降は酢酸菌の細胞膜結合型脱水素酵素に焦点が絞られ、これまでに多数の報告がなされている。その代表例として、飴山らの研究が挙げられる。これら脱水素酵素が細胞膜に結合している点から容易に推測出来る様に、酢酸菌の膜酵素は強い疎水性を有する。このため、同酵素の可溶化・精製、及びそれに続く生化学的解析は困難であった。飴山らの研究グループはこれら課題を他者に先駆けて解決し、結晶構造解析や速度論解析も可能となった事から、酢酸菌膜酵素の研究は飛躍的に進展した(17-20)。これらの知見を基に、膜酵素による酸化反応の詳細な機序が現在までに明らかにされている(21)。食酢醸造におけるエタノール酸化に着目すると、同反応は細胞膜外表層に提示された PQQ 依存型アルコールデヒドロゲナーゼ(PQQ-dependent alcohol dehydrogenase, PQQ-ADH)、及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ(aldehyde dehydrogenase, ALDH)を介して行われており(21)、アセトアルデヒドを経由して酢酸が生産される。この反応と連動し、基質酸化により得られる電子は呼吸鎖へと伝達され、末端のユビキノール・オキシダーゼを介して酸素から水への還元が行われる。このユビキノール・オキシダーゼはプロトンポンプ能も備えており、上記一連の反応を行う事で、酢酸菌は極めて効率的に細胞膜内外のプロトン勾配、すなわちエネルギーを獲得する事が出来る(図 1.1) (21)。

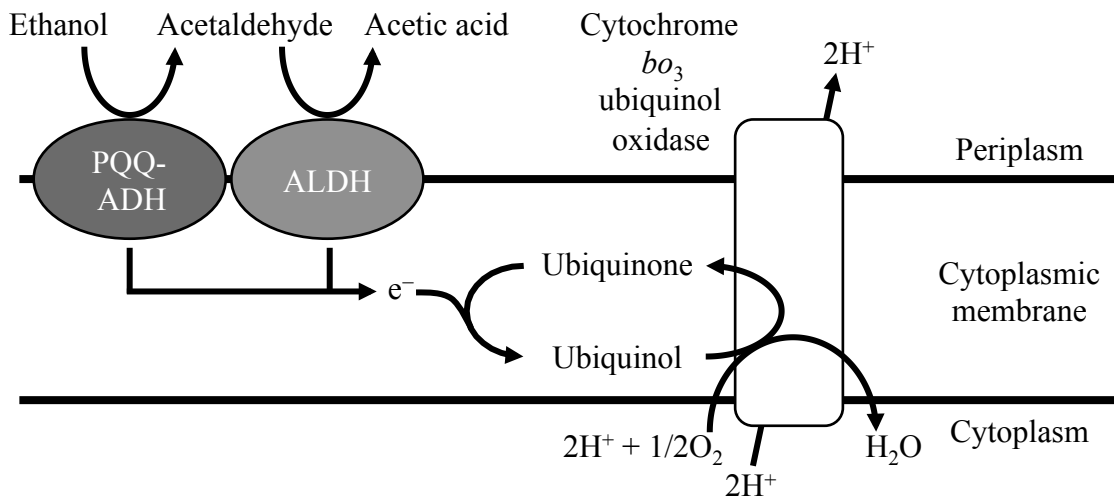


図1.1. 酢酸菌の膜結合型脱水素酵素によるエタノールの酸化(電子伝達系). エタノールは細胞膜表層に提示されたPQQ依存型アルコールデヒドロゲナーゼ(PQQ-ADH)及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)により酸化され, 酢酸が生成する. この時生じる電子(e^-)により, 受容体であるユビキノンはユビキノールへと還元される. シトクロム bo_3 ユビキノール・オキシダーゼによるユビキノールの再酸化と共役する事で, 酸素が水へ還元される. 同時に, ユビキノール・オキシダーゼはプロトンを細胞外へ排出する事で, 細胞膜内外のプロトン勾配を生み出す. Yakushi and Matsushita (21)より抜粋した.

この様に, 酢酸菌膜酵素の生化学的解析, 及び同酵素を介した酸化反応の生理学的意義に関する研究はこれまでに多数報告されているが, 酢酸菌の工業利用に目を向けると, 多くの場合, 依然「食酢生産菌」としてのみ認知される傾向にあった. しかしながら, 後述する興味深い諸特性により, 酢酸菌を食酢製造以外へ応用しようという試みが近年盛んに行われる様になっている(22). 以下にそのいくつかを例示した.

酢酸菌の産業利用に向けた新たな試み

地球上に最も多く存在するバイオポリマーとして, セルロースが挙げられる. その殆どは植物由来であるが, 多くのバクテリアがセルロース(bacterial cellulose, BC)を生産し, 菌体外へ蓄積する. BC 形成により, 紫外線・低 pH 等の環境ストレスから細胞を保護し, BC マトリクス内での自己細胞集団の優先的増殖が可能となる. この様に,

BC 中には高密度の細菌細胞が含まれるため、医療現場においては日和見感染菌の温床となりうる。それらに汚染された医療機器の使用は院内感染に繋がる恐れがあるため、BC 生合成系の解明及びその抑止に向けた研究が盛んに行われている。ナタ・デ・ココ生産酢酸菌 *Komagataeibacter xylinus* は気液面に分厚な BC 膜を形成するため、食品生産菌としてだけでなく、BC 生合成のモデルケースとしてその研究の歴史は長い(23)。*K. xylinus* 由来の BC は植物セルロースと異なり、ヘミセルロースやリグニンを含まないため極めて純度が高い。機械的強度や保湿性にも優れているため(24)、同酢酸菌が合成する BC は再生医療分野においても注目される素材であり、実際の臨床例も報告されている(25)。BC は皮膚移植における代替素材としても期待されているが、ヒトはセルロースを分解出来ないため、移植後に BC 片が体内に残存する恐れがある。近年、この課題を解決するため、*K. xylinus* セルロース合成酵素が UDP-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)も糖鎖重合の基質とする事を利用して、グルコース(Glc)及び UDP-GlcNAc からなるキメラ BC を生産する株が構築された(26)。リゾチームは (GlcNAc)₆ や(GlcNAc)₃-(Glc)₂ を認識し、その間のβ-1,4 結合を切断する。従って、このキメラ BC はリゾチーム感受性となるため、生分解性の向上した BC として移植医療における応用が期待されている。

Gluconacetobacter diazotrophicus は農業分野において注目される酢酸菌である。同酢酸菌は、サトウキビの内部共生菌として単離された窒素固定菌である。モデル微生物の一つとして世界中で研究されており、近年その完全ゲノム配列も決定された(27)。*G. diazotrophicus* は根や茎のアポプラスト内で菌叢を形成し、ニトロゲナーゼにより窒素分子をアンモニウムイオンに転換する事で窒素源を宿主に供給して、相利共生関係を構築する。窒素源に乏しい土地におけるサトウキビ栽培では、*G. diazotrophicus* の存在が収量を大きく左右する。更に、同酢酸菌はトリプトファンを基質として、植物ホルモンの一つであるインドール-3-酢酸(オーキシシン)を合成して細胞外へ放出する事で、宿主の生長を促進している事が明らかにされた(28)。また、植物病原菌の生育を

特異的に阻害するバクテリオシンの分泌や(29), 不溶性リン・亜鉛化合物を可溶化するといった(30), 農業において有益な諸特性を有する事から, *G. diazotrophicus* は化成肥料や農薬に依存しない, 持続可能な農業を実現するための有用微生物の一つとして期待を集めている.

インフルエンザ治療薬であるオセルタミビル(通称タミフル)は一般に, シキミ酸を出発基質とした半合成により生産されている. シキミ酸は, 解糖系及びペントースリン酸経路によりそれぞれ供給される, ホスホエノールピルビン酸及びエリスロース-4-リン酸を初発基質としたシキミ酸経路により生産される. しかしながら, 両初発基質が非常に多くの反応を経て供給される点, 及びシキミ酸経路そのものが代謝の末端に位置している点から, グルコースを基質とした従来までの発酵法では十分量のシキミ酸を安定的に供給する事が困難である. 代替手段として, 植物からの抽出及び化学合成法も検討されているものの, 前者は絶対量の不足, 後者は光学異性体の問題を内包するため, 現段階では現実的な解決手段とはなり得ていない. 世界保健機構により新型インフルエンザの大流行に備えたオセルタミビルの備蓄が提唱され久しいが(31), 原材料供給が不安定である事から, 効率的・合理的なシキミ酸生産法の探索が行われている. 近年, シキミ酸生産菌として酢酸菌を利用する事が検討されている. *Gluconobacter oxydans* は細胞膜結合型のキナ酸デヒドロゲナーゼ及び3-デヒドロキナ酸デヒドラターゼを有しており, キナ酸は両膜酵素により, ペリプラズム中において3-デヒドロキナ酸を経由して3-デヒドロシキミ酸へと酸化される(32). 続いて, 細胞質へ移行した3-デヒドロシキミ酸は, NADP 依存型シキミ酸デヒドロゲナーゼにより還元され, シキミ酸が生成する(33). 更に, この還元反応と, NADP 依存型 D-グルコースデヒドロゲナーゼの酸化反応(グルコース→グルコノラクトン)を共役させる事で NADPH を再生し, より効率的にシキミ酸を生産させる系が報告されている(34). グルコースを初発基質とした場合と比較して代謝が単純である点, 及びキナ酸が広く植物に含まれる物質で, 供給が容易である点から, 従来法の課題を解決する新たな発酵法

として期待されている。

スフィンゴ脂質はスフィンゴイド塩基と脂肪酸から成り、真核生物(及びいくつかの原核生物)において広く分布している。動物では、特に肌及び脳にスフィンゴ脂質が多く含まれ、細胞分化、細胞周期コントロール、老化やアポトーシスにおけるシグナル伝達において極めて重要な役割を果たしている事がこれまでに明らかにされている(35)。スフィンゴ脂質代謝異常はある種の癌、アテローム動脈硬化症、糖尿病、或いはアトピーの発症を誘発する事が知られている(35)。スフィンゴ脂質の一種であるセラミドは角質層の主要構成成分であり、細胞の接着、保湿、及び流動性に関与している(36)。この性質により、化粧品等の有効成分として広く使用されているのは周知の通りである。これに加え、セラミドはアポトーシスを促進する事で結腸癌細胞等に対して抗癌作用を示す事から(35)、医療分野においても有望な生理活性物質として着目されている。酢酸菌の細胞膜脂質は、主に 2-ヒドロキシパルミトイルスフィンガニン(ジヒドロセラミド)から成り、ジヒドロセラミドは酢酸による低 pH ストレスや高温ストレスに対する耐性に関与すると推測されている(37)。実際に、上記ストレス下で酢酸菌 *Acetobacter malorum* を培養すると、細胞膜中のジヒドロセラミド含有量は著しく上昇する(37)。この特性を利用し、酢酸菌を用いたジヒドロセラミド生産が検討されている(38)。市場にはハンドクリーム等多くのセラミド含有商品が流通しているが、植物性セラミド配合をうたうものも多く見受けられる。植物性セラミドは、スフィンゴイド塩基の構造が動物性のものと大きく異なるため(39)、動物細胞内での代謝・利用は制限されると想定される。一方、酢酸菌由来のジヒドロセラミドは動物細胞内でセラミドへ転換され、更にスフィンゴミエリン及びスフィンゴ糖脂質へと転換されうる(38)。この様に、動物体内で直接的に利用される可能性の高い酢酸菌由来セラミドは、従来品よりも有望な素材であると考えられる。

上記の様に酢酸菌は、食酢製造にとどまらない様々な有効利用の可能性を秘めた微生物である。酢酸菌を物質生産へ応用する際の最も有利な点として、前述の通り、ア

ルコール・有機酸存在下で旺盛な生育を示す事が挙げられる。エタノール酸化を例とした場合、この代謝反応により生産される酢酸は環境中の pH を低下させるため、他の微生物の生育は著しく阻害される。これは、低 pH 環境下における酢酸が主に非解離型をとり、疎水性的性質を示す事に起因する。非解離型酢酸は比較的容易に細菌細胞膜を透過し、中性に保たれた細胞質中で電離する事で細胞内 pH を低下させる。同時に、細胞膜内外のプロトン勾配を解消してしまうため、0.5%程度の低濃度であっても極めて強い細胞毒性を示す(40)。一方、酢酸菌はこれらに抵抗するための様々な酢酸耐性機構を備えている。例えば、多くの酢酸菌はクエン酸回路中に他の微生物が持たない特異なバイパスを有しており、CoA 転移酵素を介して、スクシニル CoA 由来の CoA を酢酸へ転移させる事が出来る(41)。これにより、アセチル CoA を再生すると同時に酢酸を消費する事が可能である。また、酢酸の存在によりアコニターゼ遺伝子の発現が誘導されるため、クエン酸回路の代謝回転速度が上昇する(42)。この二つの機構により、酢酸から再生されたアセチル CoA は迅速に二酸化炭素へ異化される。これらに加え、酢酸菌は細胞膜にプロトン駆動力(43)及び ABC トランスポーター(44)を介した酢酸特異的排出機構を備えているため、他の微生物にとっては致死的な量の酢酸が存在する環境下でも生育が可能となる。酢酸菌にとって、エタノールの酸化(酢酸の生産)は呼吸鎖である事を上で述べた。この様に、酢酸菌はエネルギー獲得と同時に、自己集団以外の細胞増殖を抑制する環境を形成する事が出来る。この性質により、抗生物質等高コストな選択圧を用いずとも雑菌汚染の抑止が可能であり、酢酸菌のみを優先的に増殖させる事が出来る。閉鎖培養系を用いる必要もなく、発酵工程管理が容易になる事から、微生物を用いた物質生産を実施する際、酢酸菌は魅力的なプラットフォームであると考えられる。

Komagataeibacter europaeus

上記において種々の酢酸菌の多用途性及び今後の展望に関して述べたが、酢酸菌は

食酢製造を担う産業微生物として依然重要である。現在は、2種類の発酵法が採用されている。その一つが、17世紀に技術基盤が確立された、伝統的な静置発酵法である。現代においても、当時の仕込み法を基本的に踏襲しており、酢・酒・水で調製された仕込み液を樹脂製等のタンクに充填し、そこへ酢酸菌を植菌する(3)。ここで酢酸発酵を行うのが主に *Acetobacter* 属酢酸菌であり、その代表として *Acetobacter pasteurianus* が挙げられる(45)。*A. pasteurianus* はセルロースから成る薄い菌膜を液面に張り、その中で増殖すると同時にエタノールの酸化を行う。約1ヶ月で発酵は完了し、最終的に酢酸濃度4-5%の食酢が得られる。他方、今日食酢の工業生産において主流となっているのは、バイオリクターを用いた通気発酵法である。機械的攪拌・通気により溶存酸素濃度を上昇させ、酢酸菌と酸素の接触頻度を上げる事でエタノール酸化がより効率的に行われる。発酵は数日で完了し、高濃度の酢酸(最大20%)を含む、所謂「高酸度食酢」を大量に製造出来るため、静置法と比較してより効率的な手段であると言える(3)。この通気発酵法において酢酸発酵を担うのが、*Komagataeibacter europaeus* (*Gluconacetobacter europaeus* から再分類)(46)である。

K. europaeus は他種酢酸菌と比較して、極めて強いエタノール酸化能力及び酢酸耐性を備えており、食酢工業生産において世界中で広く用いられている(40)。しかしながら、通気発酵法が確立されてからの日が浅い事も相まって、*K. europaeus* が食品産業において占める重要性にも関わらず、同酢酸菌に関する研究報告は現時点で非常に限られている。近年 タイプ株のドラフトゲノム配列が漸く決定されたが(47)、*K. europaeus* の分子遺伝学的・生化学的研究は緒に就いたばかりである。他種酢酸菌に着目すると、前述の通り、膜酵素の生化学的解析を中心とした研究が多数報告されているが、それらに加え、主に *Acetobacter* 属及び *Gluconobacter* 属酢酸菌における遺伝子破壊法に関する報告も複数なされている。手法として、塩化カルシウム法(48)、エレクトロポレーション法(49)や大腸菌との接合伝達(50)等が挙げられる。これら手法は、他の微生物においても汎用される慣習的な手法であるが、酢酸菌の場合、特に

Acetobacter 属酢酸菌においては、比較的高効率に遺伝子破壊を行う事が出来る。一方でこれら従来法は、*K. europaeus* を含む *Komagataeibacter* 属酢酸菌の遺伝子破壊に応用困難な場合が多い(51)。タイプ株のドラフトゲノム解析から、*K. europaeus* は大腸菌等と比較して、より多くの制限修飾系を有する事が推測されている(47)。外部から侵入した非自己 DNA は厳密に排除される事が予想され、この事が従来法の適用を困難にしている原因の一つであると考えられる。また従来法では、異種生物に由来する薬剤耐性遺伝子が選抜マーカーとして用いられ、遺伝子破壊株ゲノム中にそれら選抜マーカーが残存する場合が多い。従って、産業上極めて重要な *K. europaeus* の諸特性を理解し応用するためには、自己 DNA による遺伝子破壊技術、及び潜在型プラスミドを用いた遺伝子改変技術を併せた、代謝改変のための技術基盤の確立が必須である。

本研究の内容

上記の背景を踏まえ、本研究では、内在性遺伝子及び栄養要求性を、それぞれ選抜マーカー及び選択圧とした、*K. europaeus* における遺伝子破壊技術を構築した。また、同酢酸菌の潜在型プラスミドを基として、大腸菌、*K. europaeus*、及び他属酢酸菌において複製可能なシャトルプラスミドを構築し、上記遺伝子破壊技術と併せて、*K. europaeus* 代謝改変技術の基盤を構築した。更に、構築した改変技術を用いる事で、複数の有用菌株を作出した。

第 2 章では、動物において種々の生理活性作用を発揮する分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acid, BCAA) を生産する変異株を、薬剤処理によるランダム変異の導入、及びそれに続く α -アミノ酪酸 (α -aminobutyric acid, ABA) 耐性株の選抜により作出した。得られた ABAr1-56 株は野生株と比較して、著量のバリン及びロイシンを培養液中に蓄積した。本章で得られた知見は、本研究の起点となるものである。

第 3 章では、ピリミジン生合成遺伝子群の一つであるオロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (*pyrE*)、及びウラシル要求性を、それぞれ選抜マーカー及び選

扱圧とした, *K. europaeus* における遺伝子破壊技術を構築した. 本手法の有効性を検証するため, 食酢における不快醸造香・アセトインの生合成に関与する α -アセト乳酸デカルボキシラーゼ遺伝子(*aldC*)破壊株を構築した. 得られた *aldC* 破壊株のアセトイン生産性は, 野生株と比較して顕著に減少していた.

第4章では, *K. europaeus* 野生株より複数の潜在型プラスミドを単離し, それらの細胞内におけるコピー数を含めた特徴付けを行うと共に, 潜在型プラスミドを基とした, 大腸菌, *K. europaeus*, 及び他属酢酸菌において複製可能なシャトルプラスミドを構築した. これによりプラスミドを利用した遺伝子改変技術の基盤構築に成功した.

第5章では, 第2章で作出した ABAr1-56 株の変異点解析から, 転写因子 leucine responsive regulatory protein (Lrp)をコードする遺伝子(*KeLrp*)に導入されたナンセンス変異が, *K. europaeus* に BCAA 生産能を付与する決定因子であると推測し, 第3章で確立した遺伝子破壊技術を用いて, 同様の変異を導入した株を作出した. 得られた遺伝子破壊株は, ABAr1-56 株と同等の BCAA 生産性を示した. このナンセンス変異の導入により, C 末端側に位置するリガンド結合部位を持たない変異型 *KeLrp* が発現するものと推測され, *KeLrp* 破壊株及び ABAr1-56 株は, 外界の栄養状況を伝達するリガンド分子に対して非感受性であると考えられた. 併せて, BCAA 生合成遺伝子群及び排出ポンプ遺伝子の転写量解析から, *KeLrp* がそれらの発現を制御している事が明らかとなった.

第6章では, アセトインが, 食酢主成分である酢酸と共にショウジョウバエ誘引作用を発揮する点に着目し, *K. europaeus* のアセトイン生産能を向上させるべく, 第3章において確立した遺伝子破壊技術を用いて代謝改変酢酸菌を作出した. アセトイン合成系は BCAA 生合成系と一部の間代謝産物(ピルビン酸及び α -アセト乳酸)を共有している. これを踏まえ, アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ遺伝子(*ilvC*)を破壊する事でバリン生合成経路を遮断し, アセトイン高生産株を構築した. また, 第5章で作出した *KeLrp* 破壊株は, アセトイン前駆体である α -アセト乳酸の合成に関与す

るアセトヒドロキシ酸シンターゼ遺伝子(*ilvIH*)を高発現しており、副産物として著量のアセトインを培養液中に蓄積した。更に *Kelrp* 破壊株は、バリンの分解産物と考えられるイソ酪酸を微量蓄積した。*ilvC* 破壊株、及び *Kelrp* 破壊株の培養液上清を用いてショウジョウバエ捕虫実験を行ったところ、*Kelrp* 破壊株の培養液上清が最も高い誘引作用を示した。この高い誘引性は、酢酸、アセトイン、イソ酪酸、及び未同定の代謝産物の相乗効果に起因する事が示唆された。*Kelrp* 破壊株は BCAA 生産菌としてだけでなく、ショウジョウバエ誘引素材生産菌としても有望である事が示された。

第 7 章では、本研究で明らかとなった結果を総括すると共に、今後の展望と解決すべき課題について記述した。

引用文献

1. **Ettema TJ, Andersson SG.** 2009. The α -proteobacteria: the Darwin finches of the bacterial world. *Biol. Lett.* **5**:429-432.
2. **Cleenwerck I, De Wachter M, González A, De Vuyst L, De Vos P.** 2009. Differentiation of species of the family *Acetobacteraceae* by AFLP DNA fingerprinting: *Gluconacetobacter kombuchae* is a later heterotypic synonym of *Gluconacetobacter hansenii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:1771-1786.
3. 佐古田久雄, 赤坂直紀, 中山武吉. 2013. 食酢醸造の変遷と酢酸菌の新たな利用. *生物工学会誌* **91**:251-255.
4. 松下一信. 2012. 好気呼吸による「発酵」を行う酢酸菌. *生物工学会誌* **90**:340-343.
5. **Camu N, De Winter T, Verbrugge K, Cleenwerck I, Vandamme P, Takrama JS, Vancanneyt M, De Vuyst L.** 2007. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:1809-1824.
6. **Lefeber T, Janssens M, Camu N, De Vuyst L.** 2010. Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:7708-7716.
7. **Cowan G.** 2000. Rickettsial diseases: the typhus group of fevers--a review. *Postgrad. Med. J.* **76**:269-272.
8. **Kounatidis I, Crotti E, Sapountzis P, Sacchi L, Rizzi A, Chouaia B, Bandi C, Alma A, Daffonchio D, Mavragani-Tsipidou P, Bourtzis K.** 2009. *Acetobacter tropicalis* is a major symbiont of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*). *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:3281-3288.
9. **Crotti E, Rizzi A, Chouaia B, Ricci I, Favia G, Alma A, Sacchi L, Bourtzis K, Mandrioli M, Cherif A, Bandi C, Daffonchio D.** 2010. Acetic acid bacteria, newly

- emerging symbionts of insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:6963-6970.
10. **Shin SC, Kim SH, You H, Kim B, Kim AC, Lee KA, Yoon JH, Ryu JH, Lee WJ.** 2011. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science* **334**:670-674.
 11. パストゥール 山口清三郎訳 1970. 自然発生説の検討. 岩波文庫. 東京.
 12. **Nakayama T.** 1961. Studies on acetic acid bacteria. III. Purification and properties of coenzyme-independent aldehyde dehydrogenase. *J. Biochemistry* **49**:158-163.
 13. **Nakayama T.** 1961. Studies on acetic acid bacteria. IV. Purification and properties of a new type of alcohol dehydrogenase, alcohol-cytochrome-553 reductase. *J. Biochemistry* **49**:240-251.
 14. **Nakayama T, De Ley J.** 1965. Localisation and distribution of alcohol-cytochrome 553 reductase in acetic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **31**:205-219.
 15. **Murooka H, Kobayashi Y, Asai T.** 1962. Studies on oxidative fermentation Part XX. Catabolism of 5-ketogluconate by *Gluconobacter liquefaciens*. I. *Agric. Biol. Chem.* **26**:135-141.
 16. **Asai T.** 1968. Acetic acid bacteria: Classification and biochemical activities. University of Tokyo Press. Tokyo.
 17. **Adachi O, Miyagawa E, Shinagawa E, Matsushita K, Ameyama M.** 1978. Purification and properties of particulate alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.* **42**:2331-2340.
 18. **Adachi O, Tayama K, Shinagawa E, Matsushita K, Ameyama M.** 1980. Purification and characterization of membrane-bound aldehyde dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agric. Biol. Chem.* **44**:503-515.
 19. **Ameyama M, Osada K, Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O.** 1981. Purification and characterization of aldehyde dehydrogenase of *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.*

- 45:1889-1890.
20. **Adachi O, Shinagawa E, Matsushita K, Ameyama M.** 1982. Crystallization of membrane-bound alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **46**:2859-2863.
 21. **Yakushi T, Matsushita K.** 2010. Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**:1257-1265.
 22. 佐古田久雄, 赤坂直紀, 藤原伸介. 2014. 酢酸菌の新たな利用法. *日本醸造協会誌* **109**:147-153.
 23. **Ross P, Mayer R, Benziman M.** 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**:35-58.
 24. **Zhong C, Zhang GC, Liu M, Zheng XT, Han PP, Jia SR.** 2013. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**:6189-6199.
 25. **Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown RM Jr.** 2007. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* **8**:1-12.
 26. **Yadav V, Paniliatis BJ, Shi H, Lee K, Cebe P, Kaplan DL.** 2010. Novel *in vivo*-degradable cellulose-chitin copolymer from metabolically engineered *Gluconacetobacter xylinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:6257-6265.
 27. **Bertalan M, Albano R, de Pádua V, Rouws L, Rojas C, Hemerly A, Teixeira K, Schwab S, Araujo J, Oliveira A, França L, Magalhães V, Alquéres S, Cardoso A, Almeida W, Loureiro MM, Nogueira E, Cidade D, Oliveira D, Simão T, Macedo J, Valadão A, Dreschel M, Freitas F, Vidal M, Guedes H, Rodrigues E, Meneses C, Brioso P, Pozzer L, Figueiredo D, Montano H, Junior J, de Souza Filho G, Martin Quintana Flores V, Ferreira B, Branco A, Gonzalez P, Guillobel H, Lemos M, Seibel**

- L, Macedo J, Alves-Ferreira M, Sachetto-Martins G, Coelho A, Santos E, Amaral G, Neves A, Pacheco AB, Carvalho D, Lery L, Bisch P, Rössle SC, Urményi T, Rael Pereira A, Silva R, Rondinelli E, von Krüger W, Martins O, Baldani JI, Ferreira PC.** 2009. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics* **10**:450.
28. **Lee S, Flores-Encarnación M, Contreras-Zentella M, Garcia-Flores L, Escamilla JE, Kennedy C.** 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome *c* biogenesis genes. *J. Bacteriol.* **186**:5384-5391.
29. **Blanco Y, Blanch M, Piñón D, Legaz ME, Vicente C.** 2005. Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. *J. Biosci. Bioeng.* **99**:366-371.
30. **Saravanan VS, Kalaiarasan P, Madhaiyan M, Thangaraju M.** 2007. Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn^{2+}) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**:235-241.
31. **Enserink M.** 2006. Oseltamivir becomes plentiful--but still not cheap. *Science* **312**:382-383.
32. **Adachi O, Tanasupawat S, Yoshihara N, Toyama H, Matsushita K.** 2003. 3-dehydroquinone production by oxidative fermentation and further conversion of 3-dehydroquinone to the intermediates in the shikimate pathway. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**:2124-2131.
33. **Adachi O, Ano Y, Toyama H, Matsushita K.** 2006. Purification and properties of NADP-dependent shikimate dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* IFO 3244 and

- its application to enzymatic shikimate production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**:2786-2789.
34. **Adachi O, Ano Y, Toyama H, Matsushita K.** 2006. High shikimate production from quininate with two enzymatic systems of acetic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**:2579-2582.
 35. **Sawai H, Domae N, Okazaki T.** 2005. Current status and perspectives in ceramide-targeting molecular medicine. *Curr. Pharm. Des.* **11**:2479-2487.
 36. **Rawlings AV.** 2003. Trends in stratum corneum research and the management of dry skin conditions. *Int. J. Cosmet. Sci.* **25**:63-95.
 37. **Ogawa S, Tachimoto H, Kaga T.** 2010. Elevation of ceramide in *Acetobacter malorum* S24 by low pH stress and high temperature stress. *J. Biosci. Bioeng.* **109**:32-36.
 38. **Fukami H, Tachimoto H, Kishi M, Kaga T, Waki H, Iwamoto M, Tanaka Y.** 2010. Preparation of ¹³C-labeled ceramide by acetic acid bacteria and its incorporation in mice. *J. Lipid Res.* **51**:3389-3395.
 39. **Sperling P, Heinz E.** 2003. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1632**:1-15.
 40. **Trček J, Jernejc K, Matsushita K.** 2007. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. *Extremophiles* **11**:627-635.
 41. **Mullins EA, Francois JA, Kappock TJ.** 2008. A specialized citric acid cycle requiring succinyl-coenzyme A (CoA):acetate CoA-transferase (AarC) confers acetic acid resistance on the acidophile *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* **190**:4933-4940.
 42. **Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S.** 2004. Enhanced expression of aconitase raises acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. *FEMS Microbiol. Lett.* **235**:315-322.

43. **Matsushita K, Inoue T, Adachi O, Toyama H.** 2005. *Acetobacter aceti* possesses a proton motive force-dependent efflux system for acetic acid. *J. Bacteriol.* **187**:4346-4352.
44. **Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S.** 2006. Putative ABC transporter responsible for acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:497-505.
45. **Nanda K, Taniguchi M, Ujike S, Ishihara N, Mori H, Ono H, Murooka Y.** 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:986-990.
46. **Yamada Y.** 2014. Transfer of *Gluconacetobacter kakiaceti*, *Gluconacetobacter medellinensis* and *Gluconacetobacter maltaceti* to the genus *Komagataeibacter* as *Komagataeibacter kakiaceti* comb. nov., *Komagataeibacter medellinensis* comb. nov. and *Komagataeibacter maltaceti* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi: 10.1099/ijs.0.054494-0.
47. **Andrés-Barrao C, Falquet L, Calderon-Copete SP, Descombes P, Ortega Pérez R, Barja F.** 2011. Genome sequences of the high-acetic acid-resistant bacteria *Gluconacetobacter europaeus* LMG 18890^T and *G. europaeus* LMG 18494 (reference strains), *G. europaeus* 5P3, and *Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2 (isolated from vinegar). *J. Bacteriol.* **193**:2670-2671.
48. **Okumura H, Uozumi T, Beppu T.** 1985. Construction of plasmid vectors and a genetic transformation system for *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.* **49**:1011-1017.
49. **Shigematsu T, Takamine K, Kitazato M, Morita T, Naritomi T, Morimura S, Kida K.** 2005. Cellulose production from glucose using a glucose dehydrogenase gene (*gdh*)-deficient mutant of *Gluconacetobacter xylinus* and its use for bioconversion of sweet potato pulp. *J. Biosci. Bioeng.* **99**:415-422.
50. **Shinjoh M, Tomiyama N, Asakura A, Hoshino T.** 1995. Cloning and nucleotide

sequencing of the membrane-bound L-sorbose dehydrogenase gene of *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258 and its expression in *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:413-420.

51. **Hall PE, Anderson SM, Johnston DM, Cannon RE.** 1992. Transformation of *Acetobacter xylinum* with plasmid DNA by electroporation. *Plasmid* **28**:194-200.

第 2 章

分岐鎖アミノ酸高生産株のスクリーニング及び特性

第 1 節 緒言

食酢は古くから用いられてきた酸味調味料であるが、昨今の「健康志向の市場要請」、及び食酢の持つ機能性から、健康食品としても広く認知される様になった。近年の解析から、食酢の主成分である酢酸が、AMP キナーゼ(5'-AMP-activated protein kinase, AMPK)の活性化を介して II 型糖尿病に起因する症状を緩和・低減する効果を有する事が明らかにされた(1)。AMPK は骨格筋においてグルコース取り込み及び脂肪酸酸化を仲介し、肝臓においては糖新生及び脂質合成を阻害する(2, 3)。従って、食酢の習慣的な摂取により高血糖症の改善及び脂質蓄積の抑制が見込まれるため、II 型糖尿病治療の一助になると期待されている(図 2.1) (1)。また、黒酢ドリンクに代表される様に、種々の食酢をベースとした「ビネガードリンク」も市場に流通しており、健康を訴求する消費者のニーズに応える、新たな付加価値を有する食酢及びその関連商品の開発が期待されている(4)。

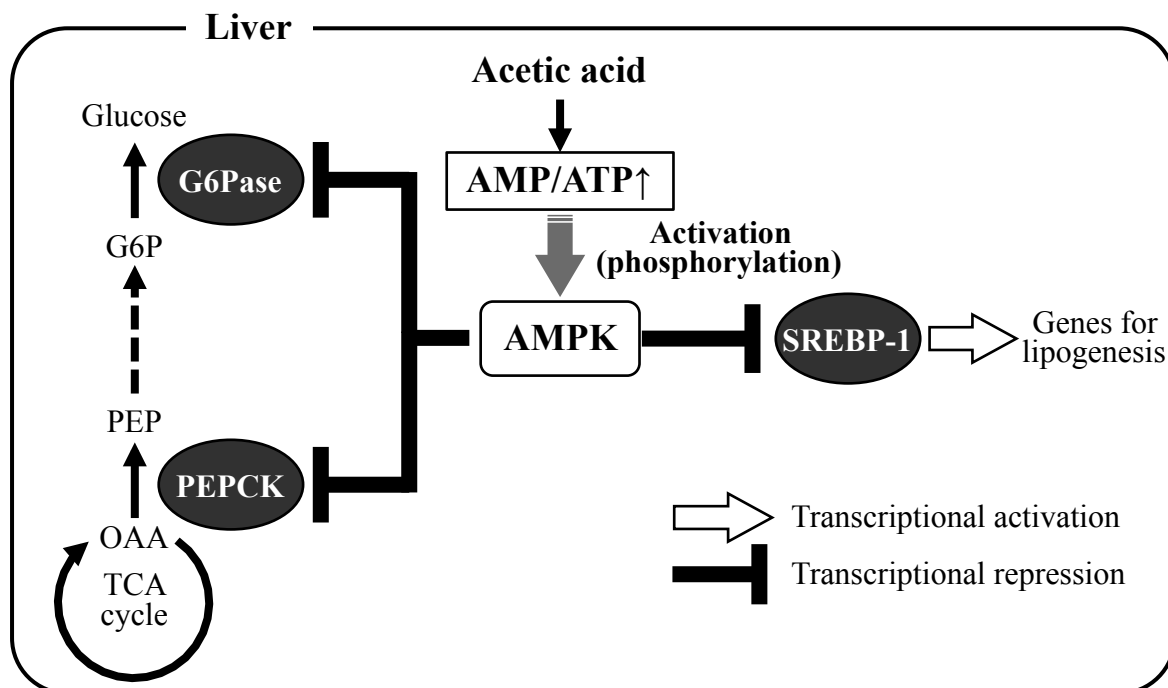


図2.1. 酢酸による糖新生及び脂質合成阻害. 酢酸の摂取により肝臓におけるAMP/ATP比が上昇し(酢酸 + ATP → アセチルCoA + AMP + PPi), AMPK (5'-AMP-activated protein kinase)のリン酸化が促進される事でその活性が上昇する. 活性化型AMPKは, 糖新生におけるPEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase)及びG6Pase (glucose 6-phosphatase), 更に脂質合成遺伝子群の発現を促進する転写因子SREBP-1 (sterol-regulatory element binding protein-1)遺伝子の転写を抑制する. OAA, oxaloacetate; PEP, phosphoenolpyruvate; G6P, glucose-6-phosphate. Sakakibara et al. (1)より抜粋した.

分岐鎖アミノ酸(branched-chain amino acid, BCAA, バリン, ロイシン, 及びイソロイシン)はヒトにおける栄養学的必須アミノ酸であると同時に, 近年その機能性から様々な食品に添加され, またサプリメントとしても広範に利用されている. 特にロイシンは, 生活習慣病諸症状を緩和・低減する効果を有する事が知られている. ロイシンの摂取により, 脂肪細胞及び骨格筋において脱共役タンパク質(uncoupling protein)の発現量が上昇し, 獲得エネルギーが熱として放散される事で, エネルギー消費量が上昇する (図 2.2) (5, 6). その結果, 高脂肪食に起因する体重増加(及びそれに伴う肥満)が抑制される(5). また, ロイシン摂取によりインスリン感受性が改善され, 更に糖新生におけるグルコース-6-ホスファターゼの発現が抑制される事から, 高血糖症が

改善される(図 2.2) (5, 7, 8). これらを踏まえると, 著量の BCAA を含む食酢は, 食酢が元来有する機能性(1)と相まって, より強力な生活習慣病改善効果を発揮しうる事が期待される.

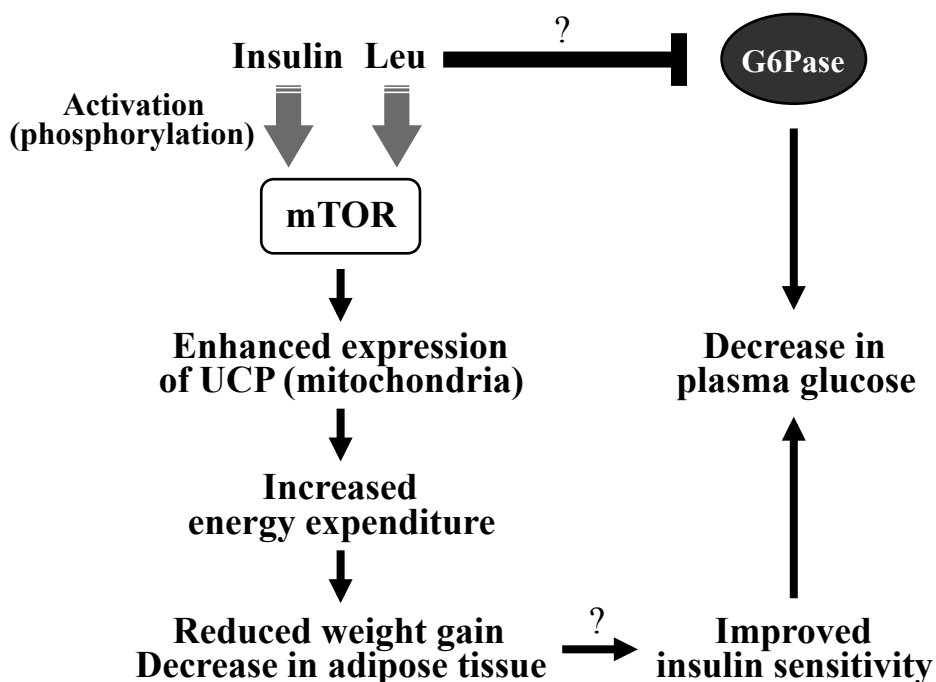


図2.2. ロイシンによる体重増加の抑制. ロイシン摂取により, インスリンシグナル伝達系の集約点に位置するmammalian target of rapamycin (mTOR, serine/threonine protein-kinase)がリン酸化(活性化)される. シグナル伝達系下流に位置する脱共役タンパク質(uncoupling protein, UCP)の発現量がミトコンドリアにおいて上昇し, 獲得エネルギーが熱として放散される事で体重増加が抑制される. また, 機序は不明であるが, ロイシン摂取によりインスリン感受性が改善されると共に, 糖新生におけるG6Pase (glucose 6-phosphatase)の転写が抑制され, 血糖値が低下する. Zhang et al. (5)より抜粋した.

微生物によるアミノ酸発酵は, 日本が世界に先駆けてその生産手法を確立した革新的技術であり, 現在までに, *Corynebacterium glutamicum*, *Serratia marcescens* や大腸菌を用いたアミノ酸生産, 及びその生産機序に関する膨大な知見が蓄積している(9, 10). 一般に微生物におけるアミノ酸生合成は, 細胞の需要に合致した必要十分量のみを供給するため, 最終産物をシグナルとしたフィードバック制御機構(律速酵素の活性阻

害及び同酵素遺伝子の転写抑制)により多重に制御されている。そのため、アミノ酸高生産株の構築には、フィードバック制御機構の破壊が有効な手段の一つである。研究黎明期より汎用されてきた手法として、薬剤による変異導入及びそれに続くアミノ酸アナログ耐性株の選抜が挙げられる。アミノ酸アナログは、対応するアミノ酸と同様にフィードバック制御機構を誘導するが、細胞はこのアナログを栄養源として利用出来ないため、アナログ存在下においてその生育は阻害される。従って、アナログ耐性株を選抜する事で、フィードバック制御機構の欠損した、標的アミノ酸を恒常的に生産する変異株を育種する事が出来る(9)。

バクテリアの BCAA 生合成経路に着目すると、多くの種が共通の代謝経路を有する事がこれまでに明らかにされている(9, 11)。バリン及びロイシンはピルビン酸を、イソロイシンはスレオニンを初発基質とし、アセトヒドロキシ酸シンターゼ (acetohydroxyacid synthase, AHAS)、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ (acetohydroxyacid isomeroreductase, AHAIR)、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (dihydroxyacid dehydratase, DHAD)、及びアミノトランスフェラーゼ (aminotransferase, AT) が 3 種の BCAA 生合成における共通反応を触媒する(図 2.3)。

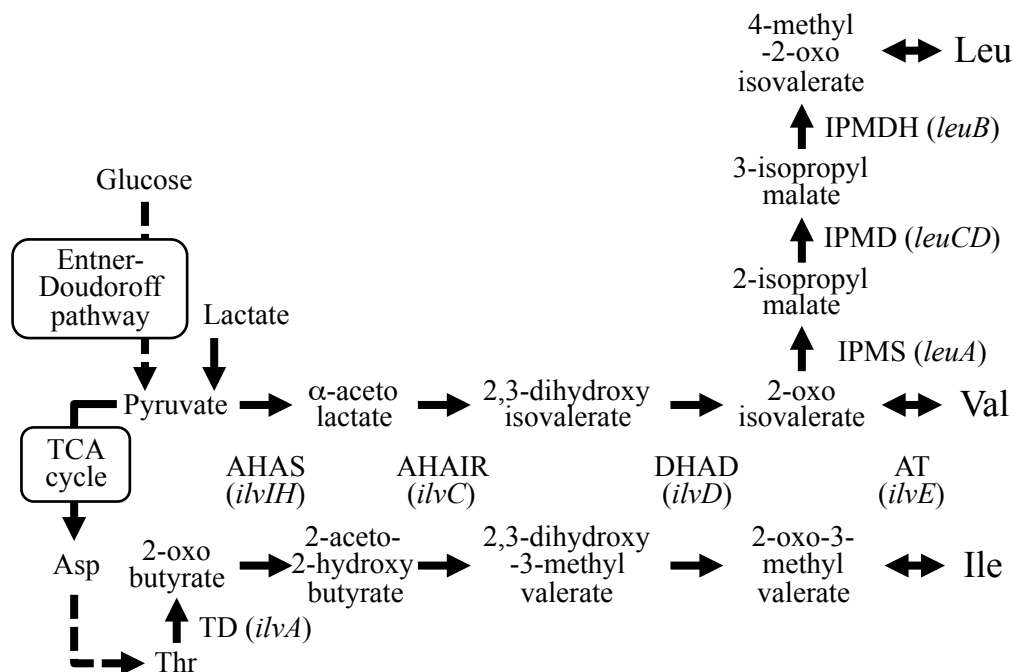


図2.3. *K. europaeus*のBCAA生合成経路. 相同性検索(TBLASTN)により, タイプ株LMG 18890^T株のドラフトゲノム配列から, *K. europaeus*におけるBCAA生合成経路を予測した. クエリとして, 完全ゲノム配列が決定されている近縁種*K. xylinus* NBRC3288株の, BCAA生合成酵素群のアミノ酸配列を用いた. TD, threonine deaminase; AHAS, aceto-hydroxyacid synthase; AHAIIR, aceto-hydroxyacid isomeroreductase; DHAD, dihydroxyacid dehydratase; AT, aminotransferase; IPMS, 2-isopropylmalate synthase; IPMD, 3-isopropylmalate dehydratase; IPMDH, 3-isopropylmalate dehydrogenase.

AHASはBCAA生合成における律速酵素の一つであり, 大腸菌はI-III型の, 3種のアイソザイムを保持する(9). 3種のAHASは, 全て触媒サブユニット(α)及び調節サブユニット(β)から成る四量体($\alpha_2\beta_2$ ホロ酵素)を形成し, 最終産物が調節サブユニットに結合する事で, 酵素活性のフィードバック阻害が誘導される(9, 11). この様に3種が共通の特徴を有する一方で, フィードバック制御に寄与する最終産物はそれぞれ異なる. *ilvIH* (*ilvI*, 触媒サブユニット遺伝子; *ilvH*, 調節サブユニット遺伝子)にコードされるIII型AHASの場合, その酵素活性及び転写はそれぞれバリン及びロイシンにより, 阻害及び抑制される(9, 11). 特に*ilvIH*の転写は, アミノ酸代謝及び輸送に関与する遺伝子群の発現を包括的に制御する転写因子, leucine responsive regulatory protein (Lrp)

により制御される(12, 13). Lrp レギュロンでは, ロイシンがシグナル(リガンド)分子として機能する(12). BCAA 生産菌作出には, ノルバリンやアザロイシン等の様々なアナログが用いられてきた(9). α -アミノ酪酸(α -aminobutyric acid, ABA)はバリンアナログとして知られており, ABA 存在下において *S. marcescens* は著しい生育阻害を示すが, ABA 耐性を有する変異株は著量のバリンを培養液中に蓄積する(11).

序論で述べた酢酸菌の多用途性, 及び上記背景を踏まえ, 本章では ABA 耐性を付与する事で BCAA を生産する *K. europaeus* の作出を試みた.

第 2 節 実験材料及び方法

供試菌株及び培地

食酢発酵液より単離した *K. europaeus* KGMA0119 株(野生株)を供試した. 栄養培地として, 酵母エキス(日本製薬, 東京) 5 g/l, ペプトン(日本製薬) 2 g/l, 及びグルコース 30 g/l から成る yeast-peptone-dextrose (YPD)培地を用いた(14). 最少培地として, グルコース 30 g/l, L-(+)-グルタミン酸ナトリウム・一水和物 10 g/l, リン酸水素二カリウム 0.1 g/l, リン酸二水素カリウム 0.5 g/l, 塩化カリウム 0.1 g/l, 塩化カルシウム・二水和物 0.1 g/l, 硫酸マグネシウム・七水和物 0.25 g/l, (+)-パントテン酸カルシウム 2 mg/l, 塩化鉄(III) 5 mg/l, 硫酸亜鉛・七水和物 50 mg/l, モリブデン(IV)酸二ナトリウム・二水和物 0.5 mg/l, ホウ酸 0.5 mg/l, 硫酸銅・五水和物 2.5 mg/l, 硫酸マンガン・五水和物 10 mg/l, 及び塩化コバルト(II) 0.5 mg/l から成る培地を用いた(14). 特に明記しない限り, 両培地に 0.4% (wt/vol)エタノール及び 0.5% (wt/vol)酢酸を加えて培養を行った. また, 固形培地として上記培地に寒天 9 g/l を加えたものを用いた. 培養は全て 30°C で行い, 液体培養の際は往復振盪 150 rpm で行った.

ABA生育阻害効果の検証

BCAA アナログとして、DL- α -ABA(シグマ・アルドリッチ社, アメリカ合衆国)を用いた。初めに, KGMA0119 株及びその派生株を 5 ml YPD 培地に接種し 16 時間培養した。得られた培養液 1 ml を 50 ml YPD 培地に接種し, 更に 24 時間培養した。菌体を遠心分離(4°C, 10,000 \times g, 5 分)により回収し, 生理食塩水(塩化ナトリウム 8.5 g/l)に再懸濁する事で細胞を洗浄した。この作業を計 2 回行い, YPD 培地由来の栄養成分を除去した。細胞懸濁液を, ABA 添加及び非添加最少培地に, 細胞密度(optical density at 660 nm, OD₆₆₀)が 0.03 となる様接種して培養を行い, OD₆₆₀ 値を経時的に測定した。ABA 非添加時における生育が定常期初期(培養 30 時間)に到達した時点の OD₆₆₀ 値を比較した。ABA の生育阻害効果は, 非添加時の OD₆₆₀ 値を 100%とした時の相対値で示した(下記)。

$[\text{ABA 添加時の OD}_{660}]/[\text{ABA 非添加時の OD}_{660}] (\%)$

また, ABA 生育阻害に対する BCAA の回復効果を検証するため, 1 mM ABA を含む最少培地に, 更にバリン, ロイシン, イソロイシン, 又は 3 種の BCAA(全て 1 mM)を加えた培地で KGMA0119 株を培養した。BCAA の回復効果は, 上記 ABA の生育阻害効果同様, ABA 及び BCAA 非添加時の OD₆₆₀ 値(定常期初期, 30 時間)を 100%とした時の相対値で示した(下記)。

$[\text{ABA 及び BCAA 添加時の OD}_{660}]/[\text{ABA 及び BCAA 非添加時の OD}_{660}] (\%)$

突然変異処理および ABA 耐性株の作出

突然変異処理及びアナログ耐性株の選抜は既報(11, 15)に準拠した。KGMA0119 株への, *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン(NTG, 和光純薬, 大阪)による変異導

入後、細胞を 2 ml YPD 培地に接種して 40 時間培養した。菌体を遠心分離により回収し、生理食塩水で洗浄・再懸濁した。細胞懸濁液を生理食塩水で適宜希釈し、50 mM ABA を含む最少寒天培地に塗布して、10 日間培養した。生じたコロニーを ABA 耐性株(ABA resistant, ABAr 株)とし、その内の一つを ABAr1-56 株として以降の実験に供試した。

ABAr1-56 株の BCAA 生産能解析

ABAr1-56 株を 20 ml 最少培地で培養し、経時的に培養液を採取した。遠心分離により菌体を除去し、上清を得た。この上清中に蓄積した BCAA を、薄層クロマトグラフィ(thin layer chromatography, TLC) (16)及びアミノ酸分析計(L-8800 形高速アミノ酸分析計, 日立テクノロジーズ, 東京)により定性・定量した。BCAA 生産における最適基質探索のため、1.0% (wt/vol) L-乳酸ナトリウム又は 1.0% (wt/vol) ピルビン酸ナトリウムを最少培地に添加して培養を行った。

第 3 節 結果

K. europaeus の BCAA 生合成経路

初めに、*K. europaeus* における BCAA 生合成経路を相同性検索により推定した。近縁種酢酸菌である *Komagataeibacter xylinus* NBRC3288 株の完全ゲノム配列は既に決定されている(17)。このゲノム情報から、*K. xylinus* は大腸菌、*S. marcescens* や *C. glutamicum* 等モデル微生物(9)と同様の、バクテリアにおいて広く保存されている BCAA 生合成経路を保持する事が予想されている。これらを踏まえ、NBRC3288 株の BCAA 生合成酵素アミノ酸配列をクエリとし、*K. europaeus* LMG 18890^T 株のドラフトゲノム配列(18)に対して相同性検索(TBLASTN)を行った。その結果、全てのクエリに対して、非常に高い同一性(>90%)を示すタンパク質をコードする遺伝子が同定された事から(表

2.1), *K. europaeus* も他バクテリア同様の代謝経路を有する事が予測された(図 2.3). 特に, 律速酵素と考えられる AHAS の触媒及び調節サブユニットのアミノ酸配列は, 大腸菌 K-12 株における III 型 AHAS の IlvI (AAC73188)及び IlvH (AAC73189)と, それぞれ 50%及び 47%の同一性を示した. 緒言において記述した様に, III 型 AHAS の酵素活性はバリンによるフィードバック阻害を受け(9, 11), またその転写はロイシンをシグナル分子とした Lrp レギュロンの制御下にある事が知られている(12). 相同性検索の結果から, *K. europaeus* も上記と類似のフィードバック制御機構を有する事が示唆されたため, フィードバック制御系が欠損した BCAA 生産株の構築には, バリン又はロイシンアナログに対する耐性を付与する事が有効であると考えられた.

表2.1. 相同性検索(TBLASTN)による*K. europaeus* BCAA生合成酵素遺伝子の推定

クエリ (<i>K. xylinus</i> NBRC3288株)			<i>K. europaeus</i> オルソログの相同性	
Accession No.	遺伝子 ^a	酵素 ^b	カバー度 (%)	同一性 (%)
BAK83415	<i>ilvA</i>	TD	100	97
BAK84097	<i>ilvI</i>	AHAS (L)	96	95
BAK84096	<i>ilvH</i>	AHAS (S)	100	97
BAK84095	<i>ilvC</i>	AHAIR	100	98
BAK84527	<i>ilvD</i>	DHAD	100	94
BAK84419	<i>ilvE</i>	AT	100	89
BAK84840	<i>leuA</i>	IPMS	99	96
BAK83331	<i>leuC</i>	IPMD (L)	100	97
BAK83330	<i>leuD</i>	IPMD (S)	100	94
BAK83329	<i>leuB</i>	IPMDH	100	97

^{a, b} 遺伝子及び酵素詳細は図2.3に記載した.

^b L, large subunit; S, small subunit.

KGMA0119 株の ABA 感受性

上記を踏まえ, KGMA0119 株の ABA に対する感受性を解析した. KGMA0119 株を,

ABA を含む最少培地で培養したところ、その生育は著しく阻害され、1mM ABA の添加で細胞増殖はほぼ完全に停止した(図 2.4A). 一方、ABA による生育阻害効果は 1 mM バリン, ロイシン, 又はイソロイシンの添加で部分的に解消された(図 2.4B). 特にロイシンは高い回復効果を示した(図 2.4B). 更に、3 種の BCAA 全てを添加すると、ABA による生育阻害は完全に解消された(図 2.4B).

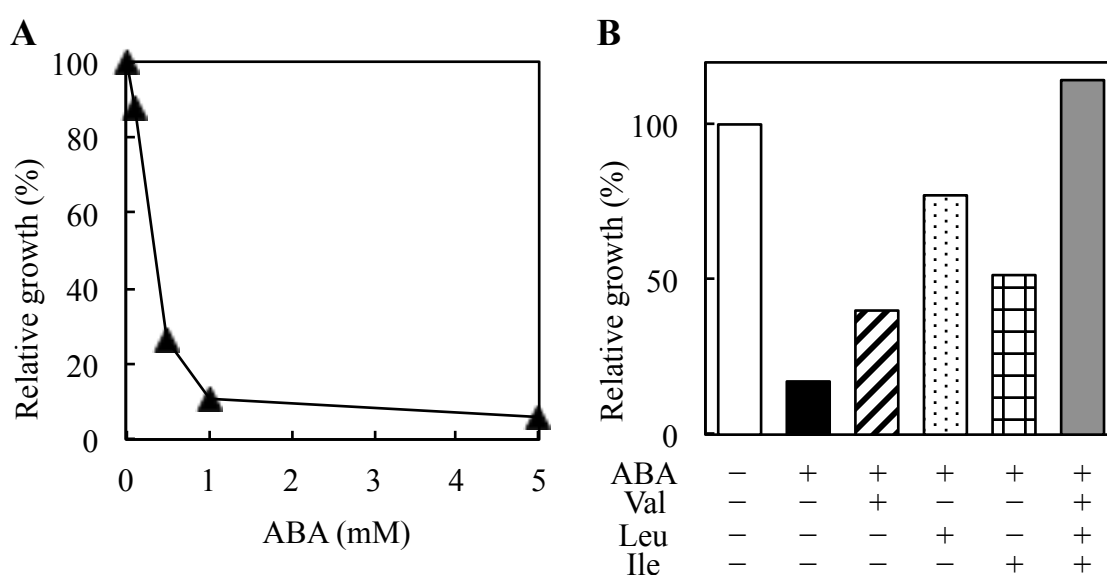


図2.4. ABAの生育阻害効果, 及びBCAAによるABA生育阻害に対する回復効果. (A) ABAの*K. europaeus*生育阻害効果. KGMA0119株(野生株)をABA非添加, 又は添加した最少培地で培養し, 非添加時における生育が定常期初期(30時間)に到達した時点の菌体量(OD₆₆₀)を比較した. ABAの生育阻害効果は, 非添加時のOD₆₆₀値を100%とした時の相対値で示した(N=3). (B) BCAAによるABA生育阻害に対する回復効果. KGMA0119株を, ABA及びBCAAを含む最少培地で培養した. 対照実験としてABA及びBCAAを含まない最少培地でも培養を行い, 同条件において, 生育が定常期初期(30時間)に到達した時点のOD₆₆₀値を比較した. BCAAによる回復効果は, ABA及びBCAA非添加時のOD₆₆₀値を100%とした時の相対値で示した(N=3). ABA及びBCAAは全て, 終濃度が1 mMとなる様添加した. 値は3回の試行の平均値を示す.

ABA 耐性株の作出

KGMA0119株細胞をNTGで処理した後, 50 mM ABAを含む最少寒天培地に塗布し,

ABA 耐性株(ABAr 株)の選抜を行った. 多数のコロニーが寒天培地上に形成され, その内の一つを ABAr1-56 株として, 同株の ABA 耐性を検証した. 5 mM ABA を添加した最少培地で KGMA0119 株及び ABAr1-56 株を培養したところ, KGMA0119 株の生育はほぼ完全に抑制されたのに対し, ABAr1-56 株は正常な生育を示した(図 2.5). 更に同株は, 10 mM ABA 存在下でも同様の生育を示した(図 2.5). これらの結果から, ABAr1-56 株が ABA 耐性を有する事が確認された.

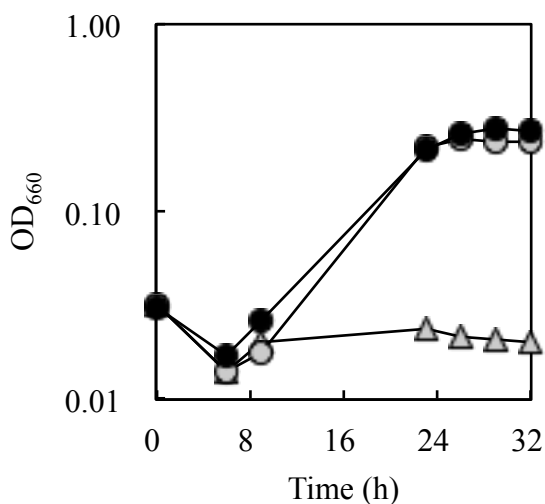


図 2.5. ABAr1-56 株の ABA 耐性. KGMA0119 株(野生株)及び ABAr1-56 株を, ABA を含む最少培地で培養した (N=3). 色: 灰色, 5 mM ABA; 黒, 10 mM ABA. 記号: 三角, KGMA0119 株; 丸, ABAr1-56 株. 値は 3 回の試行の平均値を示す.

ABAr1-56 株の BCAA 生産能

ABAr1-56 株を最少培地で培養し, 同株の生育特性解析, 及び BCAA 生産能の解析を行った. ABAr1-56 株は, 親株である KGMA0119 株と同等の生育を示した(図 2.6A). 培養液上清を経時的に採取し, 上清中に含まれる BCAA を TLC により分析した結果, ABAr1-56 株は定常期初期からバリン及びロイシンの蓄積を開始し, 培養 96 時間で, 野生株と比較し著量のバリン及びロイシンを培養液中に蓄積した(図 2.6B). アミノ酸自動分析計を用いて, 96 時間時点における ABAr1-56 株培養液上清中のバリン及びロイシン蓄積量を定量したところ, それぞれ 111 mg/l (約 1 mM)及び 20 mg/l (約 0.15 mM)であった(図 2.6C). 一方, 野生株 KGMA0119 株は, いずれの BCAA も蓄積しなかつた.

った(図 2.6B 及び C)

続いて, ABAr1-56株を用いたBCAA生産における最適基質の探索を行った. バリン及びロイシンの初発基質はピルビン酸であり(図 2.3), 遊離ピルビン酸量を上昇させる事の出来る炭素源は, BCAA 生産量上昇を図る上で有効であると考えられた. 酢酸菌の場合, ピルビン酸は通常エントナー-ドウドロフ経路, 或はペントースリン酸経路より供給されるが(19), 環境中に過剰乳酸が存在する場合, 乳酸デヒドロゲナーゼ (lactate dehydrogenase, LDH)による乳酸の酸化でも供給されうる(20). タイプ株のドラフトゲノム解析(18)からも, *K. europaeus* が LDH を保持する事が示唆されている(第3章参照). これを踏まえ, ABAr1-56 株を L-乳酸ナトリウム又はピルビン酸ナトリウムを含む最少培地で培養したところ, バリン蓄積量の顕著な上昇が見られた(図 2.6D). 標準物質シグナル強度との比較から, バリン蓄積量は両基質の添加でおよそ2倍に上昇した(図 2.6D). 一方, ロイシンの蓄積量も上昇したが, バリンの様な顕著な増加は見られず, 両基質添加の影響は限定的であった(図 2.6D).

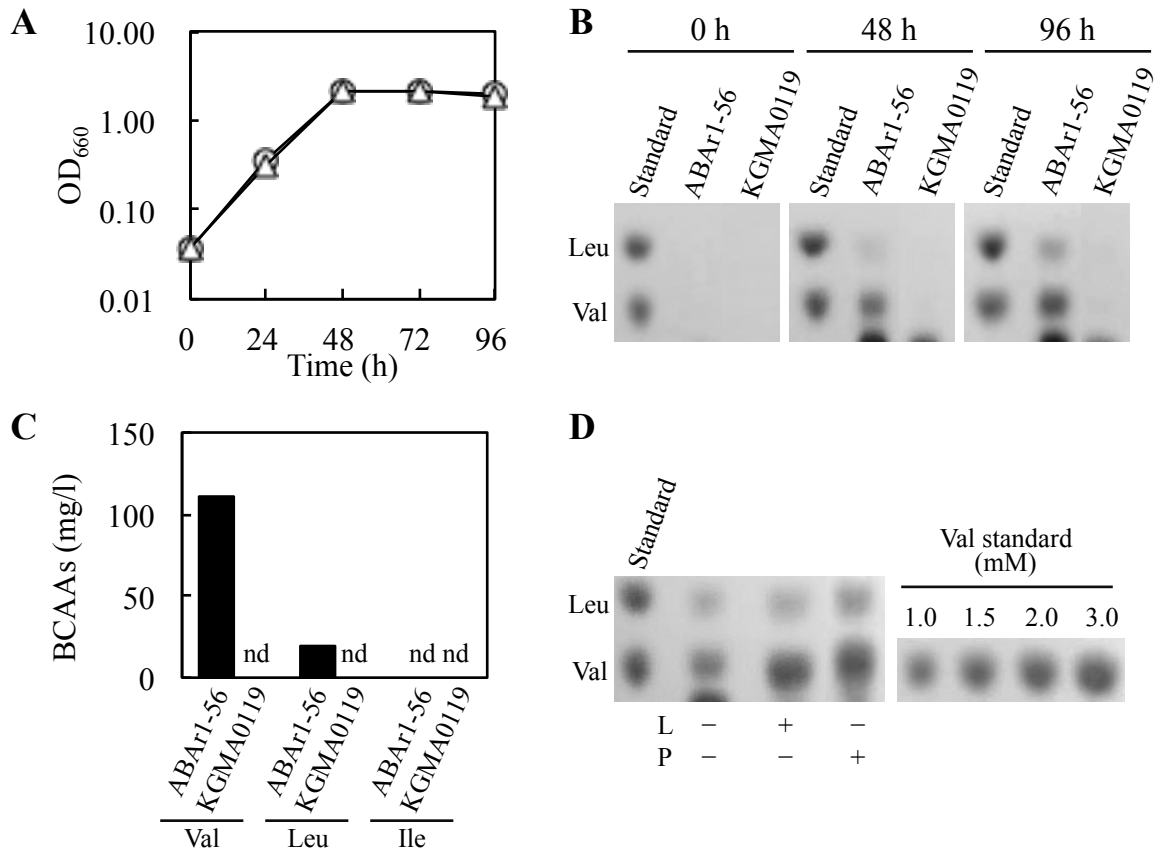


図2.6. ABAr1-56株のBCAA生産能. KGMA0119株(野生株)及びABAr1-56株を最少培地で培養し、培養液中に蓄積したBCAAをTLC及びアミノ酸自動分析計により定性・定量した。(A) OD₆₆₀. 三角; KGMA0119株; 丸, ABAr1-56株. (B) ABAr1-56株のBCAA生産能. KGMA0119株及びABAr1-56株の培養液上清を経時的に採取し、10 µlをTLCにより展開した. 標準として、1 mM バリン及びロイシンを10 µl展開した. (C) アミノ酸自動分析計によるBCAAの定量. 培養96時間時点での、培養液に蓄積したBCAAを自動分析計により定量した(図2.6B参照). nd, 検出限界(10 mg/l)以下. (D) BCAA生産における最適基質の探索. (左) 基質添加によるBCAA生産性の向上. ABAr1-56株を、1.0% L-乳酸ナトリウム、又はピルビン酸ナトリウムを含む最少培地で72時間培養し、培養液に蓄積したBCAAをTLCにより展開・定性した. 標準として、1 mM バリン及びロイシンを10 µl展開した. L, 1.0% L-乳酸ナトリウム; P, 1.0% ピルビン酸ナトリウム. (右) 各種濃度の標準液. 濃度比較のため、異なる濃度のバリン標準液10 µlを同時に展開した.

第4節 考察

野生株 KGMA0119 株の生育は ABA により著しく阻害され、その阻害効果は BCAA の添加により相殺された(図 2.4). 特に、3 種の BCAA 全てを添加した際に ABA 阻害効果が完全に解消された点、及び ABA がバリンアナログである点を考慮すると、*K. europaeus* の BCAA 生合成における律速段階は AHAS の触媒する反応である可能性高く、ABA 添加により AHAS 酵素活性が阻害され、結果として 3 種の BCAA の生合成が停滞したものと考えられる. このことから、*K. europaeus* AHAS は大腸菌 III 型 AHAS と類似のフィードバック制御(バリンによるフィードバック阻害)を受ける事が示唆された. 一方、ロイシンが最も高い生育回復効果を示したが(図 2.4B), これは既報(11)と若干異なっており、*K. europaeus* 固有の制御機構の存在が示唆される.

ABAr1-56 株はバリン及びロイシンを培養液中に蓄積したが、両者の蓄積量には差異が見られた(図 2.6). 一般に、ロイシン生合成は二段階のフィードバック阻害により制御されている. すなわち、AHAS 及び 2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (2-isopropylmalate synthase, IPMS) (図 2.3)が触媒する 2 反応が律速段階である(9). 後者の場合、ロイシンが IPMS に結合する事でその酵素活性が阻害される(21). *K. europaeus* も同様の機構を有する事が考えられ、ABAr1-56 株のロイシン蓄積がバリンよりも少なかったのは、この様な多段階制御に起因する事が示唆される. また、イソロイシン生合成もロイシン同様二段階の制御を受け、AHAS 及びスレオニンデアミナーゼ(threonine deaminase, TD) (図 2.3)が律速酵素である(9). 更に、イソロイシンの初発基質であるスレオニンは、ピルビン酸が、オキサロ酢酸及びアスパラギン酸を經由する長い反応経路において代謝される事で供給されるため(図 2.3), スレオニンに至るまでの過程において、多くの炭素が流亡する事が予想される. 従って、上記多段階制御、及び中枢代謝からの距離に起因する基質不足が、ABAr1-56 株がイソロイシンを蓄積しなかった原因であると考えられる.

フィードバック制御機構を欠損した微生物によるアミノ酸発酵は、緒言でも述べた

通り、既に確立された技術である。既報によれば、本章内容と同様の手法で作出された *S. marcescens* (11)や *C. glutamicum* (22)は、数十～数百 mM ものバリンを培地中に蓄積する。また近年、ゲノム解析等網羅的解析技術の進歩に伴い、アミノ酸を効率的に産生させるために必須な変異を *in silico* で予測し、代謝全体をデザインする事も可能となった(23)。この様な必須変異のみを集約した生産菌は、従来法(ランダム変異の導入及びその後の選抜)で得られた株と異なり、不要な変異をゲノム中に持たない。従来法では、生産性を上げるため薬剤による変異導入が複数回行われるが、その過程において、微生物が元来有する頑健さ(robustness)が失われることが多い。生産性全体(個々の細胞の生産能、及び最終菌体収量)を考慮する際、頑健さの喪失は生産効率に大きく影響しうる(24)。本章では、タイプ株 LMG 18890^T株(18)のドラフトゲノム情報から、*K. europaeus* における BCAA 生合成経路及びフィードバック制御機構を予測した。得られた知見を基に、ABA 耐性を付与する事で、バリン及びロイシンを生産する変異株 ABAr1-56 株の作出に成功した(図 2.6)。これにより、*K. europaeus* の新たな利用法を提示出来たものと考えられる。しかしながら、その生産量(バリン, 111 mg/l; ロイシン, 20 mg/l)は既存の生産菌と比較して依然低い。他の微生物において作出されている様な高生産株の構築にはより合理的な代謝デザインが必要であり、その達成には *K. europaeus* における標的遺伝子破壊技術、及びプラスミドを用いた遺伝子改変技術の確立が必須である。これらに関しては、第 3 章及び第 4 章において詳述した。また、ABAr1-56 株は BCAA 生産に寄与しない無数の変異をゲノム中に保持すると考えられる。第 5 章では、ABAr1-56 株の変異点解析から、*K. europaeus* に BCAA 生産性を付与する変異を同定した。更に、第 3 章において確立した遺伝子破壊法を用いて、親株に ABAr1-56 株と同じ変異を導入する事で BCAA 生産菌を作出した。併せて、その生産機序についても詳述した。

第 5 節 要約

比較ゲノム解析から, *Komagataeibacter europaeus* は他の微生物と類似の分岐鎖アミノ酸(branched-chain amino acid, BCAA)生合成経路を有しており, 過剰生産を抑制するフィードバック制御機構の存在が推測された. 本章では, バリンアナログである α -アミノ酪酸(α -aminobutyric acid, ABA)耐性株を作出する事で, 本酢酸菌の BCAA 生産の可能性を検討した. 食酢発酵液より単離された *K. europaeus* KGMA0119 株を *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジンで処理し, 多数の ABA 耐性株(ABA resistant, ABAr 株)を得た. その一つを ABAr1-56 株とし, その BCAA 生産能を解析した. ABAr1-56 株は定常期初期からバリン及びロイシンを蓄積し, 最終的に 111 mg/l のバリン及び 20 mg/l のロイシンを培養液中に蓄積した. バリン及びロイシンの初発基質はピルビン酸であり, 細胞内の遊離ピルビン酸量の上昇が期待される L-乳酸ナトリウム及びピルビン酸ナトリウムを添加して培養を行ったところ, 非添加時と比較してバリン蓄積量は約 2 倍に上昇した. ロイシンの蓄積量も僅かに上昇した. 本章で得られた知見は, 酢酸菌 *K. europaeus* が BCAA 生産菌として利用出来る可能性を示唆する.

引用文献

1. **Sakakibara S, Yamauchi T, Oshima Y, Tsukamoto Y, Kadowaki T.** 2006. Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A (y) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**:597-604.
2. **Hardie DG.** 2004. AMP-activated protein kinase: a master switch in glucose and lipid metabolism. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **5**:119-125.
3. **Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER.** 2003. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* **546**:113-120.
4. 佐古田久雄, 赤坂直紀, 藤原伸介. 2014. 酢酸菌の新たな利用法. *日本醸造協会誌.* **109**:147-153.
5. **Zhang Y, Guo K, LeBlanc RE, Loh D, Schwartz GJ, Yu YH.** 2007. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes* **56**:1647-1654.
6. **Arakawa M, Masaki T, Nishimura J, Seike M, Yoshimatsu H.** 2011. The effects of branched-chain amino acid granules on the accumulation of tissue triglycerides and uncoupling proteins in diet-induced obese mice. *Endocrinol. Jpn.* **58**:161-170.
7. **Guo K, Yu YH, Hou J, Zhang Y.** 2010. Chronic leucine supplementation improves glycemic control in etiologically distinct mouse models of obesity and diabetes mellitus. *Nutr. Metab (Lond).* **7**:57.
8. **Macotela Y, Emanuelli B, Bang AM, Espinoza DO, Boucher J, Beebe K, Gall W, Kahn CR.** 2011. Dietary leucine - an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. *PLOS ONE* **6(6)**:e21187.
9. 相田浩, 滝波弘一, 千畑一郎, 中山清, 山田秀明. 1986. アミノ酸発酵. 学会出版センター. 東京.
10. **Sano C.** 2009. History of glutamate production. *Am. J. Clin. Nutr.* **90**:728S-732S.

11. **Kisumi M, Komatsubara S, Chibata I.** 1971. Valine accumulation by α -aminobutyric acid-resistant mutants of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. **106**:493-499.
12. **Cho BK, Barrett CL, Knight EM, Park YS, Palsson BØ.** 2008. Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **105**:19462-19467.
13. **Platko JV, Willins DA, Calvo JM.** 1990. The *ilvIH* operon of *Escherichia coli* is positively regulated. J. Bacteriol. **172**:4563-4570.
14. **Akasaka N, Sakoda H, Hidese R, Ishii Y, Fujiwara S.** 2013. An efficient method using *Gluconacetobacter europaeus* to reduce an unfavorable flavor compound, acetoin, in rice vinegar production. Appl. Environ. Microbiol. **79**:7334-7342.
15. **Ohmori S, Uozumi T, Beppu T.** 1982. Loss of acetic acid resistance and ethanol oxidizing ability in an *Acetobacter* strain. Agric. Biol. Chem. **46**:381-389.
16. 日本生物工学会編. 2002. 生物工学実験書 改訂版. 培風館. 東京.
17. **Ogino H, Azuma Y, Hosoyama A, Nakazawa H, Matsutani M, Hasegawa A, Otsuyama K, Matsushita K, Fujita N, Shirai M.** 2011. Complete genome sequence of NBRC 3288, a unique cellulose-nonproducing strain of *Gluconacetobacter xylinus* isolated from vinegar. J. Bacteriol. **193**:6997-6998.
18. **Andrés-Barrao C, Falquet L, Calderon-Copete SP, Descombes P, Ortega Pérez R, Barja F.** 2011. Genome sequences of the high-acetic acid-resistant bacteria *Gluconacetobacter europaeus* LMG 18890^T and *G. europaeus* LMG 18494 (reference strains), *G. europaeus* 5P3, and *Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2 (isolated from vinegar). J. Bacteriol. **193**:2670-2671.
19. **Krajewski V, Simic P, Mouncey NJ, Bringer S, Sahn H, Bott M.** 2010. Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* for improved growth rate and growth yield on glucose by elimination of gluconate formation. Appl. Environ. Microbiol. **76**:4369-4376.

20. **Asai T.** 1968. Acetic acid bacteria: classification and biochemical activities. University of Tokyo Press. Tokyo.
21. **Koon N, Squire CJ, Baker EN.** 2004. Crystal structure of LeuA from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in leucine biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **101**:8295-8300.
22. **Tsuchida T, Yoshinaga F, Kubota K, Momose H.** 1975. Production of L-valine by 2-thiazolealanine resistant mutants derived from glutamic acid producing bacteria. Agric. Biol. Chem. **39**:1319-1322.
23. **Park JH, Lee KH, Kim TY, Lee SY.** 2007. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and *in silico* gene knockout simulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **104**:7797-7802.
24. **Ikeda M, Mitsuhashi S, Tanaka K, Hayashi M.** 2009. Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* L-arginine and L-citrulline producer. Appl. Environ. Microbiol. **75**:1635-1641.

第3章

ウラシル要求性を指標とした遺伝子破壊技術の構築

第1節 緒言

序論において記述した通り、現時点における *Komagataeibacter europaeus* の研究例は極めて限られており、同酢酸菌を物質生産へ応用するには、自己 DNA を選抜マーカー遺伝子とした遺伝子破壊技術の確立が必須である。内在性遺伝子を用いる遺伝子破壊法として、5-フルオロオロト酸(5-fluoroorotic acid, 5-FOA)及びピリミジン生合成遺伝子を、それぞれ選択圧及び選抜マーカーとして用いる遺伝子破壊法が、酵母(1)、バクテリア(2, 3)、及び超好熱性アーキア(4-7)まで、生物界をまたいで広く確立されている。ピリミジン生合成における最終の2反応は、*pyrE* 遺伝子及び *pyrF* 遺伝子にコードされる、オロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (orotate phosphoribosyltransferase, OPRase)及びオロチジン-5'-一リン酸デカルボキシラーゼ (orotidine-5'-monophosphate decarboxylase, OMPdecase)が触媒する。ピリミジン生合成系の中間代謝産物であるオロト酸は、両酵素によりウリジン-5'-一リン酸 (uridine-5'-monophosphate, UMP)へと代謝されるが、オロト酸のフッ化物アナログである 5-FOA も同様の反応を経て、致死性の細胞毒 5-フルオロウリジン-5'-一リン酸 (5-fluorouridine-5'-monophosphate, 5-FUMP)へ転換される。5-FUMP は UMP 同様に RNA 合成の基質として用いられるため、結果として転写が攪乱される(図 3.1A)。 *pyrE* 又は *pyrF* 遺伝子の欠損により、細胞は 5-FOA 耐性を獲得するが、同時にウラシル要求性となる(図 3.1A)。この様に、正常に機能する *pyr* 遺伝子を保持するか否かにより、細胞はウラシル原栄養性かつ 5-FOA 感受性、又はウラシル要求性かつ 5-FOA 耐性を示す。この性質を利用する事で、*pyr* 遺伝子を選抜マーカーとした双方向への選抜が可能となる。

一般に食酢製造は、異なる微生物が関与する多段階の発酵工程からなる。第一に、

コウジカビによる米・穀物等の糖化が行われる。第二に、得られた糖化液を原料として、酵母によるエタノール発酵が行われる。最後に、酢酸菌がエタノールを酸化(酢酸の生産)する事で食酢製造工程が完了する。この様に、食酢製造には種々の微生物が関与する事から、食酢の香味は原料だけでなく、これら微生物が生産する様々な発酵代謝産物(有機酸や揮発性成分)によって大きく影響される。代表的な例として、アセトイン及びジアセチルが挙げられる。両物質はチーズ或いはバター様の重い臭気を持つ揮発性成分であり、多くの乳製品に含まれる化合物である。乳製品では好ましい風味を与える一方で、米酢や日本酒においては不快臭として認知されている。実際に、アセトインやジアセチルを著量含む様な食酢は、特に若い世代を中心に忌避される傾向にある。従って、高品質な食酢を製造する上で、アセトイン及びジアセチルの蓄積を厳密に管理する事は重要な課題の一つであると言える。

乳酸菌や枯草菌等、多くの微生物が発酵代謝産物としてアセトインを生産する。上記の通り、乳製品において風味を特徴付ける物質である事から、それら微生物のアセトイン合成経路は詳細に研究されている(8-10)。アセトインはピルビン酸を初発基質とし、中間代謝産物 α -アセト乳酸を経由して合成される(図 3.5A)。これら反応は、ピルビン酸 2 分子を縮合する α -アセト乳酸シンターゼ(α -acetolactate synthase, ALS)、及び α -アセト乳酸を脱炭酸する事でアセトインを生成する α -アセト乳酸デカルボキシラーゼ(α -acetolactate decarboxylase, ALDC)により触媒される(図 3.5A)。一方、 α -アセト乳酸は化学的に不安定であるため、非酵素反応的に脱炭酸され、ジアセチルを生じる(図 3.5A)。生じたジアセチルは更に、ジアセチルレダクターゼ(diacetyl reductase, DR)によりアセトインへと還元される(図 3.5A)。アセトイン合成経路は、分岐鎖アミノ酸(branched-chain amino acid, BCAA)生合成経路と中間代謝産物(ピルビン酸及び α -アセト乳酸)を共有し、BCAA 生合成経路の律速酵素であるアセトヒドロキシ酸シンターゼ(acetohydroxyacid synthase, AHAS)は ALS と同じ反応を触媒する(11)。しかしながら、両代謝経路の生理学的意義は大きく異なる。BCAA 生合成経路が炭素の同化経路であ

るのに対し、アセトイン合成経路は、所謂「オーバーフロー代謝」の一つである(12). 環境中に炭素源が過剰に存在する場合、中枢代謝における代謝不均衡が生じうる. 結果として、中枢代謝の集約点に位置するピルビン酸が過剰に蓄積し、細胞内の酸性化が引き起こされる. 乳酸菌や枯草菌はこの様な状況を回避するため、ピルビン酸を中性のアセトインへと転換する事で、細胞内の恒常性を保つと考えられている(10, 13). 更に、これら微生物は過剰炭素をアセトインとして外部に貯蔵し、栄養飢餓時に炭素源として利用する事も知られている事から(9), アセトイン合成経路は微生物の生存戦略上重要な代謝経路である事が示唆される. 酢酸菌を過剰乳酸存在下で培養するとアセトインを蓄積する事が古くから知られており(14, 15), この事から、他の微生物種と同様の意義・機能を有するアセトイン合成経路を、酢酸菌も保持する事が示唆される.

これら背景を踏まえ、*K. europaeus* における内在性 *pyrE* 遺伝子を選抜マーカーとした遺伝子破壊技術を構築すると共に、同技術を用いてアセトイン合成経路遺伝子 *aldC* 及び *als* を破壊する事で、アセトイン非生産株の構築を試みた.

第 2 節 実験材料及び方法

供試菌株及び培地

本章において供試した菌株及びプラスミドを表 3.1 に記載した. *K. europaeus* の培養には、yeast-peptone-dextrose (YPD)培地(16)又は最少培地(16)を用いた. 培養は全て 30°C で行い、液体培養の際は往復振盪 150 rpm で行った. 特に明記しない限り、両培地に 0.4% (wt/vol)エタノール及び 0.5% (wt/vol)酢酸を加えて培養を行った. 固形培地での培養の際は、YPD 培地及び最少培地に 9 g/l の寒天を加えたものを用いた. *pyrE* 欠失株に選抜には、最少寒天培地に 0.2% (wt/vol) 5-FOA (和光純薬, 大阪)及び 60 µg/ml ウラシルを添加したものを用いた. 遺伝子破壊ベクターの構築には大腸菌 DH5α株

(タカラバイオ, 滋賀) (17)を用いた. DH5 α 株の培養には 50 μ g/ml アンピシリン(シグマ・アルドリッチ社, アメリカ合衆国)を添加した Lysogeny broth (LB 培地) (18)を用い, 37°C で培養した.

DNA 操作及びシーケンス解析

一般的な DNA 操作に関する手法は既報(18)に準拠した. *K. europaeus* のピリミジン生合成経路及びアセトイン合成経路, 及びそれら代謝経路に関与する酵素遺伝子の塩基配列は, タイプ株 LMG 18890^T 株のドラフトゲノム配列(19)に対する相同性検索 (TBLASTN)により同定した. クエリとして, 完全ゲノム配列が決定されている近縁種酢酸菌 *Komagataeibacter xylinus* NBRC3288 株(20)の, 対応するアミノ酸配列を用いた (*pyrE*, YP_004867468; *pyrF*, YP_004868701; *aldC*, YP_004868152; *als*, YP_004868151). PCR の際の DNA ポリメラーゼとして, KOD plus (東洋紡, 大阪)又は *Pfu-X* (グライナー社, ドイツ)を用いた. PCR プライマーは, タイプ株 LMG 18890^T 株のドラフトゲノム配列を基に設計した. 制限酵素及び各種修飾酵素は, タカラバイオ又はニッポン・ジーン(東京)より購入した. アガロースゲル電気泳動後の標的 DNA の精製には, NucleoSpin Gel and PCR Cleanup Kit (タカラバイオ)を用いた. 遺伝子破壊ベクター構築には, クローニングベクターとして pUC19 (21)又は pBR322 (22)を用いた(共にタカラバイオ). プラスミド DNA の抽出は, アルカリ抽出法(18)又は Plasmid Midi Kit (キアゲン社, ドイツ)を用いて行った. DNA シーケンス解析は, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 及び Model 3130 Capillary Sequencer (共にアプライド・バイオシステムズ社, アメリカ合衆国)を用いて行った.

表3.1. 供試菌株及びプラスミド

株・プラスミド	特徴	出典
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	17
<i>K. europaeus</i>		
KGMA0119株	食酢発酵液より単離(野生株)	16
KGMA0704株	KGMA0119株由来 <i>pyrE</i> 欠失株(Δ <i>pyrE</i>)	本研究
KGMA4004株	KGMA0704株由来 <i>aldC</i> 破壊株(Δ <i>pyrE</i> Δ <i>aldC</i> :: <i>pyrE</i>)	本研究
KGMA5315株	KGMA0704株由来 <i>als</i> 破壊株(Δ <i>pyrE</i> Δ <i>als</i> :: <i>pyrE</i>)	本研究
プラスミド		
pUC19	Amp ^r	21
pBR322	Amp ^r	22
pUC19- Δ <i>pyrE</i>	pUC19由来 <i>pyrE</i> 破壊ベクター(図3.3参照)	本研究
pBR322- Δ <i>aldC</i> :: <i>pyrE</i>	pBR322由来 <i>aldC</i> 破壊ベクター(図3.6参照)	本研究
pBR322- Δ <i>als</i> :: <i>pyrE</i>	pBR322由来 <i>als</i> 破壊ベクター(図3.6参照)	本研究

遺伝子破壊ベクターの構築

遺伝子破壊ベクターの構築に用いた PCR プライマーを、図 3.1 及び 3.5, 及び表 3.2 に記載した。尚、標的遺伝子は遺伝子破壊ベクターとの相同組換え(double crossover homologous recombination)により破壊した。また、特に明記のない限り、被破壊遺伝子を含む領域の PCR 増幅の際には、*K. europaeus* KGMA0119 株(野生株)の全 DNA を鋳型として用いた。DNA 断片の連結には、DNA リガーゼ(Ligation-Convenience Kit, ニッポン・ジーン)を用いた。必要に応じ、プライマーの 5'末端を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ(タカラバイオ)を用いてリン酸化した。*pyrE* 翻訳領域(open reading frame, ORF), 及びその 5'側上流及び 3'側下流領域(共に 1.0 kb)を含む 2.7 kb の領域を、EU-F 及び ED-R を用いた PCR により増幅した(図 3.1B)。得られた PCR 産物及び pUC19 を EcoRI

及び BamHI で消化した後、両者を連結した。次に、5'末端をリン酸化した E5'-R 及び E3'-F を用い、中間プラスミドを鋳型としたインバース PCR(図 3.1B)を行う事で、*pyrE* ORF の 672 bp を除去した。得られた PCR 産物を自己環化させ、これを *pyrE* 破壊ベクター(pUC19- $\Delta pyrE$)とした(図 3.3)。

続いて、以下に示す手順で *aldC* 及び *als* 破壊ベクターを構築した。5'末端をリン酸化した EP-F2 及び E-R4 を用いて、*pyrE* ORF 全長及びそのプロモーター領域を含む 1.5 kb の領域(*pyrE* マーカー)を PCR 増幅した(図 3.1B)。次に、*aldC* ORF 及びその 5'側上流及び 3'側下流領域(共に 1.0 kb)を含む 2.9 kb の領域を、aldC-F 及び aldC-R を用いて PCR 増幅した(図 3.5B)。得られた PCR 産物及び pBR322 を EcoRI 及び ClaI で消化した後、両者を連結した。得られた中間プラスミドを鋳型とし、aldC-i1 及び aldC-i2 を用いたインバース PCR(図 3.5B)を行う事で、*aldC* ORF の 813 bp を除去した。得られた PCR 産物、及び 5'末端をリン酸化した *pyrE* マーカーを連結し、*aldC* 破壊ベクター(pBR322- $\Delta aldC::pyrE$)とした(図 3.6A)。同様に、*als* ORF 及びその 5'側上流及び 3'側下流領域(共に 1.0 kb)を含む 3.4 kb の領域を、als-F2 及び als-R2 を用いて PCR 増幅した(図 3.5B)。得られた PCR 産物及び pBR322 を ClaI 及び BamHI で消化した後、両者を連結した。得られた中間プラスミドを鋳型とし、als-i1 及び als-i2 を用いたインバース PCR(図 3.5B)を行う事で、*als* ORF の 1,509 bp を除去した。得られた PCR 産物、及び 5'末端をリン酸化した *pyrE* マーカーを連結し、*als* 破壊ベクター(pBR322- $\Delta als::pyrE$)とした(図 3.6B)。

表3.2. プライマー

プライマー	配列 (5' - 3') ^a	目的
EU-F	<u>GGAATTC</u> GATCGCCATCCACGACGAAT	<i>pyrE</i> 破壊
ED-R	CGGGATCCAGCCCGGAAAACATTCAGCA	<i>pyrE</i> 破壊
E5'-R	GGAGCCTGTTGAAAGTCCAG	<i>pyrE</i> 破壊
E3'-F	GAAGAAGCACTGGCGCTGAA	<i>pyrE</i> 破壊
EP-F2	CTGCCATATCCCGTGTTCGT	<i>pyrE</i> マーカー
E-R4	TCGCCATAGGGAAAGACTGC	<i>pyrE</i> マーカー・遺伝子型同定
EP-F3	ATCCCCACCAGCATGTTTCA	遺伝子型同定
aldC-F	<u>AGAATTC</u> GATCACGCTCGAAACCCTGT	<i>aldC</i> 破壊
aldC-R	<u>AAATCGAT</u> CGATATCCCCACCAGTTCA	<i>aldC</i> 破壊
aldC-i1	ATTCACGAAGCCATTCGCGTGGCTG	<i>aldC</i> 破壊
aldC-i2	GATTGCCCGAGAATGGTGAAGCAGG	<i>aldC</i> 破壊
aldC-F2	CCTGAACCTTCATTTCAATGGTGCG	遺伝子型同定
aldC-R2	GTCCATGCTCTGGTGCGTAAGCTTC	遺伝子型同定
als-F2	<u>AAATCGAT</u> AGGAGACTCAGGTCTTGAAGCTGAA	<i>als</i> 破壊・遺伝子型同定
als-R2	<u>AAGGATCC</u> GTTCAGTTGATGCTGGATTCG	<i>als</i> 破壊
als-i1	AATCACCTGCTGATGAAGCCGCTG	<i>als</i> 破壊
als-i2	GTCAAACAGGCGGTCCACCTTC	<i>als</i> 破壊
ldh-i2	AGTACACGCCACTGTTCCACCAG	遺伝子型同定
pyrE-probe-F1	CCTTCATCTATCCGCGCAAC	サザンブロット解析
pyrE-probe-R1	ACAGGTCGCCTGCATGATCT	サザンブロット解析
aldC-probe-F1	AATGTGCCACAGGACGAGGT	サザンブロット解析
aldC-probe-R1	TGAAGGTTTCAGGACGACACG	サザンブロット解析

^a 制限酵素認識配列を下線で示した。

遺伝子破壊株の構築

K. europaeus の遺伝子破壊は、遺伝子破壊ベクターをエレクトロポレーション法(23)により導入する事で行った。始めに、以下に示す手順に従い *pyrE* 欠失株を作出した。KGMA0119 株を、1.6% (wt/vol)エタノール及び 1.0% (vol/vol)セルラーゼ(シグマ・アルドリッチ社)を添加した 30 ml YPD 培地で対数期中期(OD₆₆₀ = 0.2-0.3)まで培養し、

細胞を遠心分離(4°C, 6,000 × g, 5分)により回収した。菌体ペレットを氷冷した滅菌水に再懸濁した後, 再度遠心分離で菌体を回収した。続いて, 菌体ペレットを氷冷した 10% (vol/vol)グリセロールに再懸濁した後, 遠心分離により菌体を回収した。このグリセロール溶液による洗浄を計 2 回行い, 最終的に OD₆₆₀ 値が 30 となる様, 菌体を少量の 10%グリセロールに再懸濁した。これをコンピテントセルとし, 使用時まで -80°C で凍結保存した。45 μl のコンピテントセルと *pyrE* 破壊ベクター(pUC19-Δ*pyrE*)を, 氷冷したエレクトロポレーションキュベット(ギャップ幅 0.1 cm, バイオラッド・ラボラトリーズ社, アメリカ合衆国)内で混和した後, ECM630 Electroporation System (ハーバード・アパラタス社, アメリカ合衆国)を用いて電気パルス(2.5 kV, 200 Ω, 25 μF)を与えた。細胞を, 氷冷した 1 ml YPD 培地に直ちに懸濁し, 30°C で 16 時間振盪培養した。培養液を生理食塩水(塩化ナトリウム 8.5 g/l)で適宜希釈し, 5-FOA 及びウラシルを添加した最少寒天培地に塗布した後, 30°C で 2-3 日間保温した。寒天上に生じた 5-FOA 耐性かつウラシル要求性を示すコロニーを候補株とし, それらから全 DNA を抽出した。候補株の遺伝子型は, 抽出した全 DNA を鋳型とし, EP-F3 及び E-R4 を用いた PCR(図 3.3), 得られた PCR 産物のシーケンス解析, 及びサザンブロット解析(下記参照)により同定した。得られた *pyrE* 欠失株を KGMA0704 株(Δ*pyrE*)とし(図 3.3), 以降の遺伝子破壊実験に供試した。

KGMA0704 株を用い, 上記と同様の手法でコンピテントセルを作製した。尚, KGMA0704 株の培養には, YPD 培地にウラシルを添加したものをを用いた。KGMA0704 株コンピテントセル, 及び *aldC* 破壊ベクター(pBR322-Δ*aldC*::*pyrE*)又は *als* 破壊ベクター(pBR322-Δ*als*::*pyrE*)を, 氷冷したエレクトロポレーションキュベット内で混和し, 上記と同条件の電気パルスを与えた。細胞を, 氷冷した 1 ml YPD 培地に直ちに懸濁し, 30°C で 3 時間振盪培養した。遠心分離(4°C, 6,000 × g, 5分)により菌体を回収し, 生理食塩水に再懸濁して洗浄した。再度遠心分離により回収した菌体を少量の生理食塩水に懸濁し, それをウラシル非添加の 5 ml 最少培地へ接種した。ウラシル原栄養性

株を集積するため、30°C で 48 時間以上培養した。培養液を生理食塩水で適宜希釈し、ウラシル非添加の最少寒天培地に塗布した後、30°C で 2-3 日間保温した。寒天上に生じたコロニーを候補株とし、それらから全 DNA を抽出した。候補株の遺伝子型は、*pyrE* 欠失株と同様に、全 DNA を鋳型とした PCR、PCR 産物のシーケンス解析、及びサザンブロット解析(下記参照)により同定した。*aldC* 及び *als* 遺伝子座の PCR 増幅には、それぞれ *aldC*-F2 – *aldC*-R2 及び *als*-F2 – *ldh-i2* のプライマーペアを用いた(図 3.6)。得られた *aldC* 破壊株及び *als* 破壊株を、それぞれ KGMA4004 株($\Delta pyrE \Delta aldC::pyrE$)及び KGMA5315 株($\Delta pyrE \Delta als::pyrE$)とし、以降の実験に供試した。

サザンブロット解析

サザンブロット解析は、DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (ロシュ社, アメリカ合衆国)を用いて行った。KGMA0119 株及びその派生株から全 DNA を抽出し、得られた全 DNA 5 μ g を、*pyrE* 遺伝子座を標的とした際は PvuII, *aldC* 及び *als* 遺伝子座を標的とした際は SmaI で消化し(図 3.3 及び 3.6)、制限断片を 0.7% (wt/vol) アガロースゲル電気泳動により分離した後、エレクトロブロッティング法(Trans-Blot Cell, バイオラット・ラボラトリーズ社) (18)によりナイロンメンブレン(Hybond-N+, GE 社, アメリカ合衆国)へ転写した。プローブとして、図 3.3 及び 3.6 に示した *pyrE* probe 及び *aldC* probe を用いた。両プローブは、*pyrE*-probe-F1 – *pyrE*-probe-R1 及び *aldC*-probe-F1 – *aldC*-probe-R1 のプライマーペアを用い、KGMA0119 株全 DNA から PCR 増幅した(図 3.3 及び 3.6)。得られた PCR 産物をジゴキシゲニン(digoxigenin, DIG)-dUTP で標識し、ハイブリダイゼーション反応(50°C, 16 時間)に用いた。ハイブリダイゼーションの手順は、メーカー推奨のプロトコールに準拠した。

ガスクロマトグラフィー(gas chromatography, GC)による揮発性成分の定量

KGMA0119 株, KGMA4004 株, 及び KGMA5315 株を、0.3% (wt/vol) L-乳酸ナトリウ

ムを添加した 30 ml YPD 培地で培養し、少量の培養液上清を経時的に採取した。上清中のエタノール、酢酸、アセトイン、及びジアセチル濃度を GC (GC-14A, 島津製作所, 京都)により定量した。成分の分離にはパックド・カラム(polyethylene glycol 20M 10% ShinCarbon A 60/80 2.1 m × 3.2 mm, 信和化工, 京都)を用いた。カラム・オーブンの温度は、60°C で 3 分間保持した後、昇温速度 10°C/分で 200°C まで上昇させた。

塩基配列のアクセッション番号

K. europaeus KGMA0119 株の *pyrE*, *pyrF*, *aldC*, *als*, 及び 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、それぞれ AB818355, AB818356, AB818357, AB828456, 及び AB818453 のアクセッション番号の下、データベース DDBJ, EMBL, 及び GenBank に登録された。

第 3 節 結果

K. europaeus のピリミジン生合成経路

K. europaeus におけるピリミジン生合成経路を推定するため、タイプ株 LMG 18890^T 株のドラフトゲノム配列(19)に対する相同性検索(TBLASTN)を行った。クエリとして、近縁種 *K. xylinus* NBRC3288 株(20)の、ピリミジン生合成酵素群のアミノ酸配列を用いた。その結果、ピリミジン生合成に必須な 6 酵素(及びそのサブユニット)をコードする、8 つの ORF が同定された。このことから、*K. europaeus* も他の微生物と同様の、一般的なピリミジン生合成経路を持つ事が示された(図 3.1)。OPRTase をコードする *pyrE* 遺伝子は 26 番コンティグ(CADP01000026)上において同定され、グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子(*glutamate racemase*, *gr*)とクラスター構造を形成していた(図 3.1B)。OMPdecase をコードする *pyrF* 遺伝子は 8 番コンティグ(CADP01000008)上に位置し、未知タンパク質(hypothetical protein)をコードする遺伝子、及びアントラニル酸イソメラーゼをコードする *trpF* とクラスターを形成していた。*K. europaeus* の OPRTase は 253

アミノ酸残基から成り，その配列は *K. xylinus* NBRC3288 の OPRase (YP_004867468) と 98%，大腸菌 K-12 株の OPRase (NP_418099) と 33% の同一性を示した．同様に，*K. europaeus* の OMPdecase は 235 アミノ酸残基から成り，*K. xylinus* NBRC3288 (YP_004868701) 及び大腸菌 K-12 株 (NP_415797) の OMPdecase オルソログと，それぞれ 82% 及び 43% の同一性を示した．

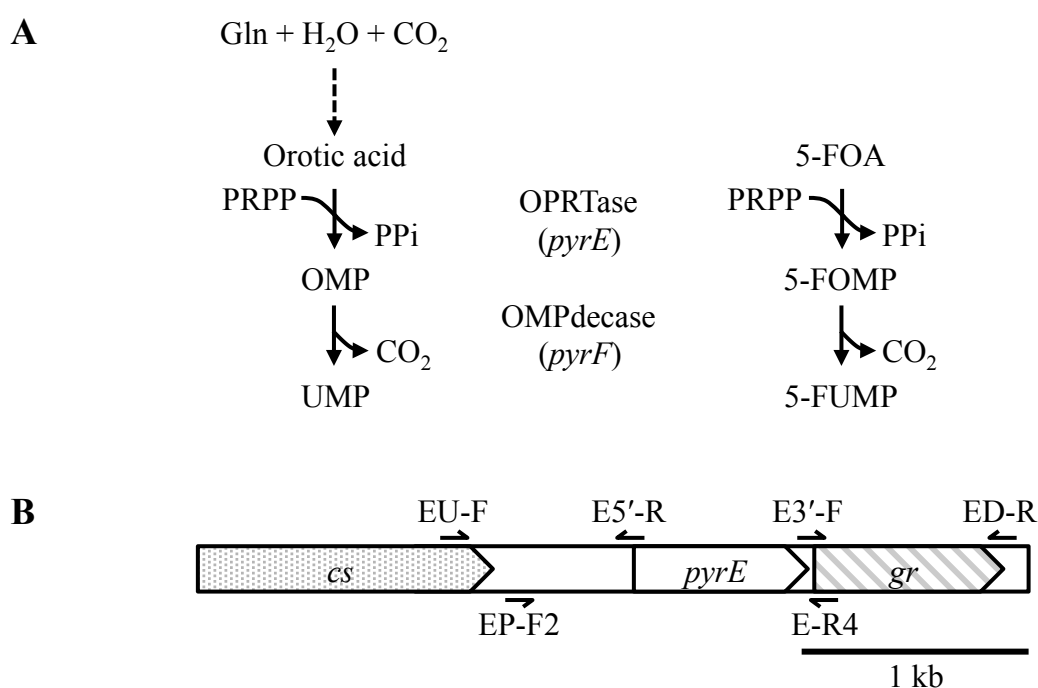


図3.1. *K. europaeus* のピリミジン生合成経路及び *pyrE* 遺伝子座. (A) タイプ株 LMG 18890^T 株ドラフトゲノム配列より推測された *K. europaeus* におけるピリミジン生合成経路. PRPP, 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate; PPi, pyrophosphate; OMP, orotidine-5'-monophosphate; UMP, uridine-5'-monophosphate; 5-FOA, 5-fluoroorotic acid; 5-FOMP, 5-fluoroorotidine-5'-monophosphate; 5-FUMP, 5-fluorouridine-5'-monophosphate; OPRase, orotate phosphoribosyltransferase; OMPdecase, orotidine-5'-monophosphate decarboxylase. (B) *K. europaeus* の *pyrE* 遺伝子座. 模式図上部及び下部に示した矢印は，それぞれ *pyrE* 破壊ベクター及び *pyrE* マーカーカセット作製に用いたプライマーを表す(図3.3参照). *cs*, citrate synthase; *gr*, glutamate racemase.

続いて、*K. europaeus* の 5-FOA 感受性を解析するため、野生株である KGMA0119 株を、0.2% 5-FOA を含む最少培地で培養したところ、その生育は著しく阻害された(図 3.2)。また一般に、*pyrE* 或いは *pyrF* の欠損により、細胞は 5-FOA 耐性を獲得する代わりにウラシル要求性となる(1)。この事が *K. europaeus* にも該当するかどうかを検証するため、KGMA0119 株を YPD 液体培地で対数期中期まで培養し、得られた細胞を、5-FOA 及びウラシルを添加した最少寒天培地に塗布した。多数のコロニーが寒天培地上に形成されたが、それのうち 5-FOA 耐性かつウラシル要求性を示す株のみを選抜した。両表現型を示す株は、 2.9×10^{-6} の頻度で出現した。その中から無作為に 10 株を選抜し、*pyrE* 及び *pyrF* 遺伝子座のシーケンス解析を行った。その結果、調査した全ての株において、*pyrE* 又は *pyrF* ORF 中に、アミノ酸置換又はナンセンス変異を伴う点変異が検出された(データ示さず)。これらの結果は、*K. europaeus* においても *pyr* 遺伝子を選抜マーカーとした遺伝子破壊系構築が可能である事を強く示唆する。これを踏まえ、*pyrE* 欠失株の作出を試みた。

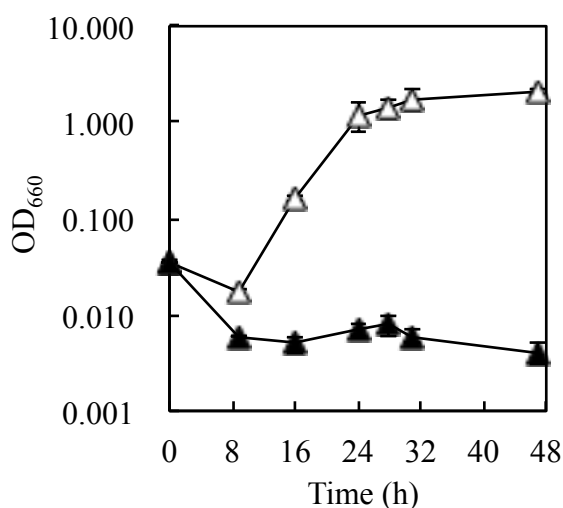


図3.2. KGMA0119株(野生株)の5-FOA感受性. KGMA0119株を、0.2% 5-FOAを含まない、或いは含む最少培地で培養した。白、5-FOA非添加；黒、5-FOA添加。エラーバーは標準偏差を表す(N=3)。

pyrE 欠失株の構築

第2節に記述した手法により、KGMA0119株へ *pyrE* 破壊ベクター(pUC19- $\Delta pyrE$)を

導入する事で, *pyrE* 欠失株の作出を試みた(図 3.3). 5-FOA 耐性及びウラシル要求性を示す複数の候補株が得られ, その一つを KGMA0704 株として以下の実験に供試した. KGMA0119 株及び KGMA0704 株を最少培地で培養したところ, KGMA0119 株はウラシル添加の有無を問わず生育したのに対し, KGMA0704 株はその正常な生育にウラシルを要求した(図 3.4). 続いて, KGMA0704 株の遺伝子型を, PCR 及びサザンブロット解析により同定した. KGMA0119 株及び KGMA0704 株の *pyrE* 遺伝子座を, EP-F3 及び E-R4 (図 3.3)を用いて PCR 増幅した. その結果, KGMA0704 株の *pyrE* 遺伝子座(1.0 kb) は, 親株である KGMA0119 株(1.7 kb)よりも短い事が明らかとなった(図 3.7A). 更に, *pyrE* ORF 上流領域と相補な *pyrE* probe (図 3.3)を用いたサザンブロット解析からも同様の結果が得られた(KGMA0119 株, 3.9 kb; KGMA0704 株, 3.2 kb) (図 3.7A). これら結果は *pyrE* 遺伝子の欠失を示すものであり, この事は PCR 産物のシーケンス解析からも確認された. 一方, KGMA0704 株の *pyrF* 遺伝子に変異は生じておらず, KGMA0704 株の 5-FOA 耐性かつウラシル要求性は, *pyrE* 欠失のみに起因する事が示された. これらを踏まえ, KGMA0704 株($\Delta pyrE$)を宿主として, 以降の遺伝子破壊実験を行った. 尚, *pyrE* 遺伝子の欠失は, PCR により調製した直鎖状 DNA の導入でも達成可能である(データ示さず).

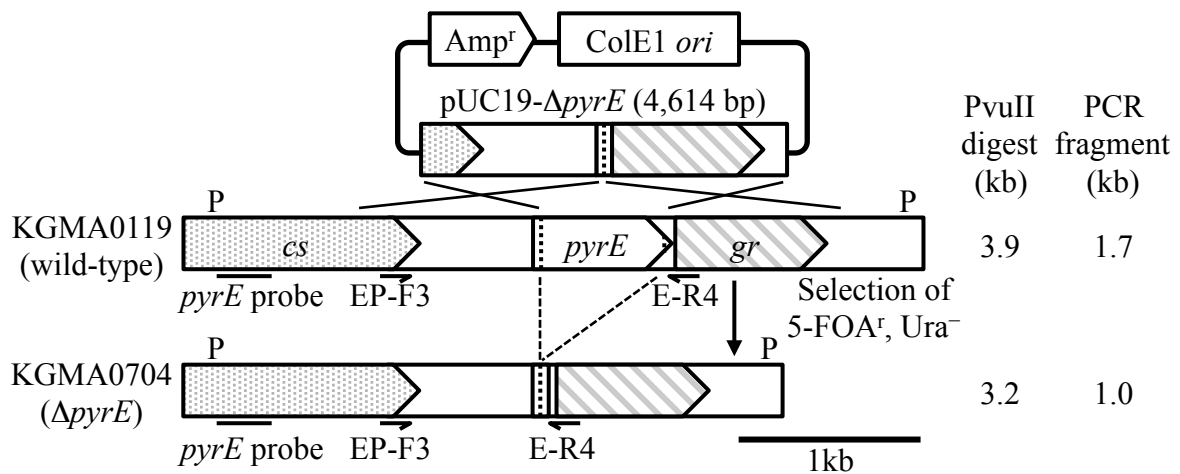


図3.3. *pyrE*欠失株の構築. *pyrE*破壊ベクター(pUC19- $\Delta pyrE$)をKGMA0119株(野生株)へ導入し, 5-FOA耐性かつウラシル要求性株を選抜した. 得られた*pyrE*欠失株をKGMA0704株($\Delta pyrE$)とした. KGMA0704株の遺伝子型は, サザンブロット解析, PCR (図3.7参照), 及び得られたPCR産物のシーケンス解析により同定した. それら解析に用いたプローブ(*pyrE* probe)及びプライマー(EP-F3 – E-R4)を, 模式図下部に示した. 染色体DNAのPvuII消化により得られる*pyrE*遺伝子座を含む消化断片の長さ, 及び図に示すプライマーを用いたPCRにより増幅される産物の長さを模式図右に示した(図3.7参照). P, PvuII認識配列. 各遺伝子の詳細は図3.1に記載した.

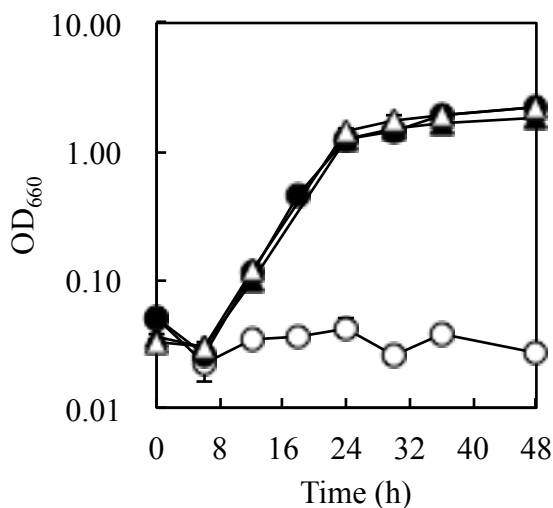


図3.4. *pyrE*欠失株のウラシル要求性. KGMA0119株(野生株)及びKGMA0704株($\Delta pyrE$)を, 60 $\mu\text{g/ml}$ ウラシルを含まない, 或いは含む最少培地で培養した. 色: 白, ウラシル非添加; 黒, ウラシル添加. 記号: 三角, KGMA0119株; 丸, KGMA0704株. エラーバーは標準偏差を表す($N=3$).

aldC 及び *als* 破壊株の構築

次に, *K. europaeus* におけるアセトイン合成経路を推定した. ピリミジン生合成経路

推定時と同様に, *K. xylinus* NBRC3288 株の対応するアミノ酸配列をクエリとし, *K. europaeus* LMG 18890^T 株ドラフトゲノム配列に対して相同性検索(TBLASTN)を行った. その結果, α -アセト乳酸デカルボキシラーゼをコードする *aldC* 遺伝子が, 6 番コンティグ(CADP01000006)上で同定された. *aldC* は *als*, *ldh* (乳酸デヒドロゲナーゼ[lactate dehydrogenase, LDH]をコード), 及び *pdh* 遺伝子(ピルビン酸デカルボキシラーゼ [pyruvate decarboxylase, PDC]をコード)とクラスターを形成していた (図 3.5B). この結果から, *K. europaeus* は他種酢酸菌同様, 乳酸をアセトインへ転換する事が示唆された. 更に, 48 番コンティグ(CADP01000048)上において, ジアセチルレダクターゼをコードすると考えられる ORF も同定された. その ORF のコードするアミノ酸配列は, 乳酸菌 *Lactococcus lactis* のオルソログ(YP_001031692)と比較的高い同一性(34%)を示した. *K. europaeus* の ALDC は 296 アミノ酸残基からなり, *K. xylinus* NBRC3288 株 (YP_004868152)及び *Bacillus subtilis* (CAB07786)のオルソログと, それぞれ 95%及び 40%の同一性を示した. また, *K. europaeus* の ALS は *B. subtilis* のオルソログ (CAB07802)と高い同一性(50%)を示した. これらの結果から, *K. europaeus* は, 枯草菌や乳酸菌と同様のアセトイン合成経路を保持する事, 並びに, *aldC* 又は *als* の破壊が, アセトイン生産能を低下させる上で効果的である事が示唆された.

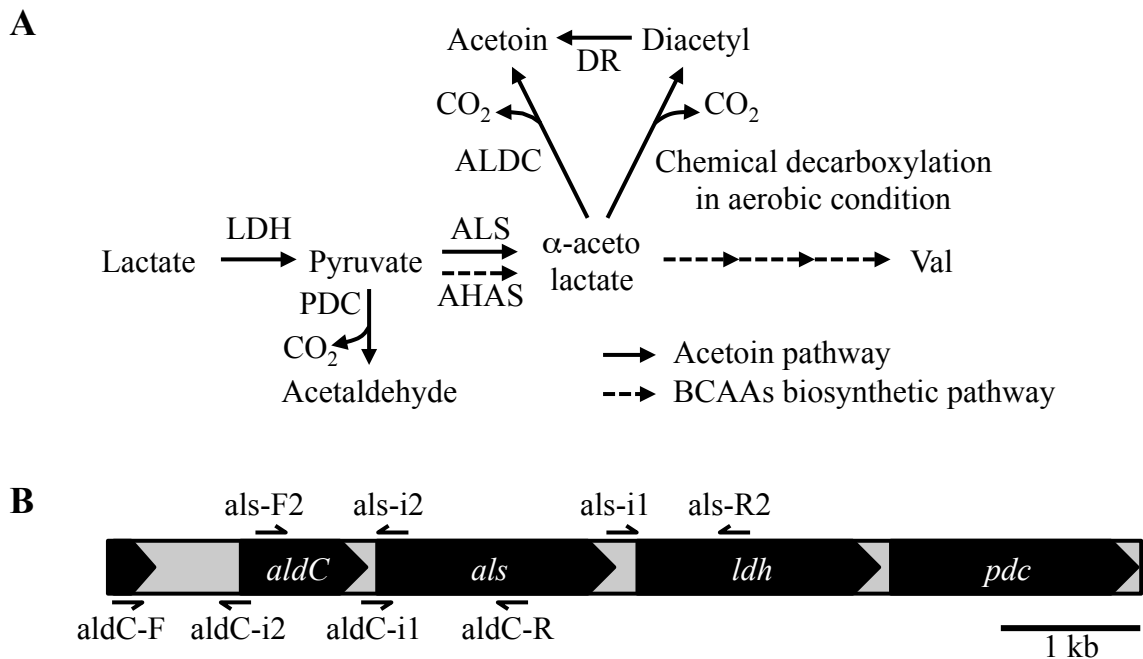


図3.5. *K. europaeus*のアセトイン合成経路及び*aldC*遺伝子座. (A) タイプ株LMG 18890^T株ドラフトゲノム配列より推測された*K. europaeus*におけるアセトイン合成経路. LDH, lactate dehydrogenase; PDC, pyruvate decarboxylase; ALS, α -acetolactate synthase; AHAS, acetohydroxyacid synthase; ALDC, α -acetolactate decarboxylase; DR, diacetyl reductase. 実線及び破線矢印は、それぞれアセトイン合成経路及びBCAA生合成経路を示す. (B) *K. europaeus*の*aldC*遺伝子座. 模式図上部及び下部に、それぞれ*als*破壊ベクター及び*aldC*破壊ベクター作製に用いたプライマーを示した(図3.6参照). *aldC*, α -acetolactate decarboxylase; *als*, α -acetolactate synthase; *ldh*, lactate dehydrogenase; *pdc*, pyruvate decarboxylase.

上記を踏まえ、KGMA0704株へ*aldC*破壊ベクター(pBR322- Δ *aldC*::*pyrE*)又は*als*破壊ベクター(pBR322- Δ *als*::*pyrE*)を導入し、*aldC*又は*als*破壊株の作出を試みた(図3.6). ウラシル原栄養性を示すコロニーが複数得られ、*aldC*及び*als*破壊実験で得られた候補株の一つを、それぞれKGMA4004株及びKGMA5315株として、それらの遺伝子型をPCR及びサザンブロット解析により同定した. KGMA0119株, KGMA0704株, 及びKGMA4004株の*aldC*遺伝子座を、aldC-F2及びaldC-R2(図3.6A)を用いてPCR増幅した. その結果、KGMA0119株及びKGMA0704株から増幅されたDNA断片(1.8 kb)と比較して、KGMA4004株からはより長いDNA断片(2.4 kb)が増幅された(図3.7B). *aldC*

ORF 上流領域と相補な *aldC* probe (図 3.6A)を用いたサザンブロット解析からも同様の結果が得られた(KGMA0119 株及び KGMA0704 株, 2.4 kb; KGMA4004 株, 3.1 kb) (図 3.7B). 次に, KGMA5315 株 *als* 遺伝子座の遺伝子型を解析した. *als* 遺伝子座が *pyrE* マーカーにより置換された場合, *als* ORF 中の *SmaI* 及び *EcoRI* 認識部位は消失する(図 3.6B). これを踏まえ, KGMA0119 株, KGMA0704 株, 及び KGMA5315 株の *als* 遺伝子座を, *als*-F2 及び *ldh-i2* を用いて PCR 増幅した(図 3.6B). 全ての株から 3.0 kb の PCR 産物が検出されたが(図 3.7C), 得られた産物を *EcoRI* で消化したところ, KGMA5315 株由来の PCR 産物のみ切断されなかった(図 3.7C). 更に, 上記 3 株の全 DNA を *SmaI* で消化した後, *aldC* probe (図 3.6B)を用いたサザンブロット解析を行ったところ, KGMA5315 株(3.7 kb)からは, KGMA0119 株及び KGMA0704 株(2.4 kb)よりも長い DNA 断片が検出された(図 3.7C). これらの結果は, KGMA4004 株及び KGMA5315 株の *aldC* 及び *als* 遺伝子が *pyrE* 遺伝子により置換された事を示すものであり, 両遺伝子の破壊は PCR 産物のシーケンス解析からも確認された. KGMA4004 株及び KGMA5315 株を, それぞれ *aldC* 破壊株($\Delta pyrE \Delta aldC::pyrE$)及び *als* 破壊株($\Delta pyrE \Delta als::pyrE$)とし, 両株のアセトイン生産能を以降の実験で検証した.

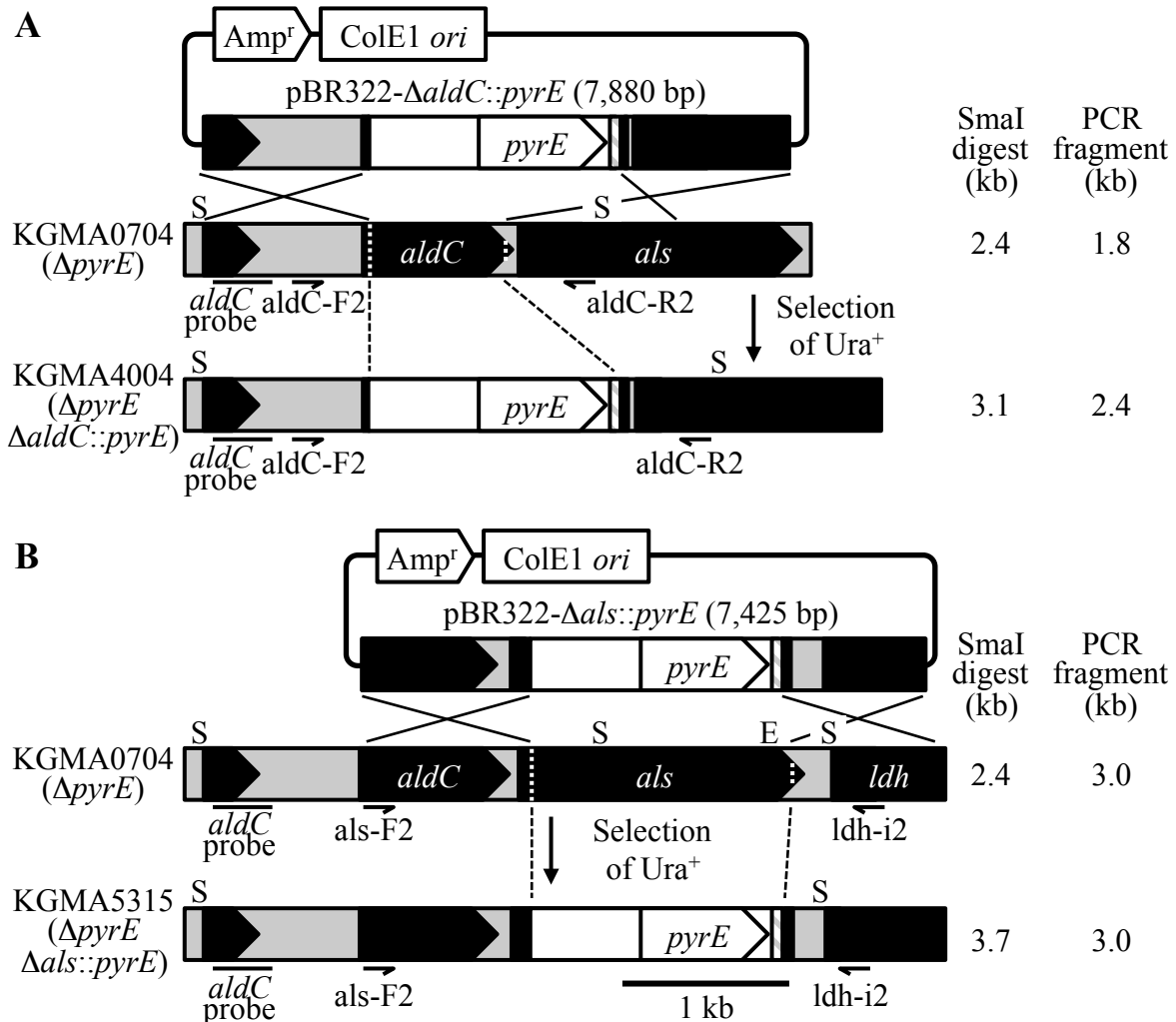


図3.6. *aldC*及び*als*破壊株の構築. (A) *aldC*破壊株の構築. (B) *als*破壊株の構築. *aldC*破壊ベクター(pBR322- $\Delta aldC::pyrE$)又は*als*破壊ベクター(pBR322- $\Delta als::pyrE$)をKGMA0704株($\Delta pyrE$)へ導入し、ウラシル原栄養性株を選抜した. 得られた*aldC*又は*als*破壊株を、それぞれKGMA4004株($\Delta pyrE \Delta aldC::pyrE$)又はKGMA5315株($\Delta pyrE \Delta als::pyrE$)とした. 遺伝子破壊株の遺伝子型は、サザンプロット解析、PCR(図3.7参照)、及び得られたPCR産物のシーケンス解析により同定した. それら解析に用いたプローブ(*aldC* probe)及びプライマー(*aldC*-F2 – *aldC*-R2及び*als*-F2 – *ldh*-i2)を、模式図下部に示した. 染色体DNAのSmaI消化により得られる、*aldC*又は*als*遺伝子座近傍を含む消化断片の長さ、及び図に示すプライマーを用いたPCRにより増幅される産物の長さを模式図右に示した. S, SmaI認識配列; E, EcoRI認識配列. 各遺伝子の詳細は図3.5に記載した.

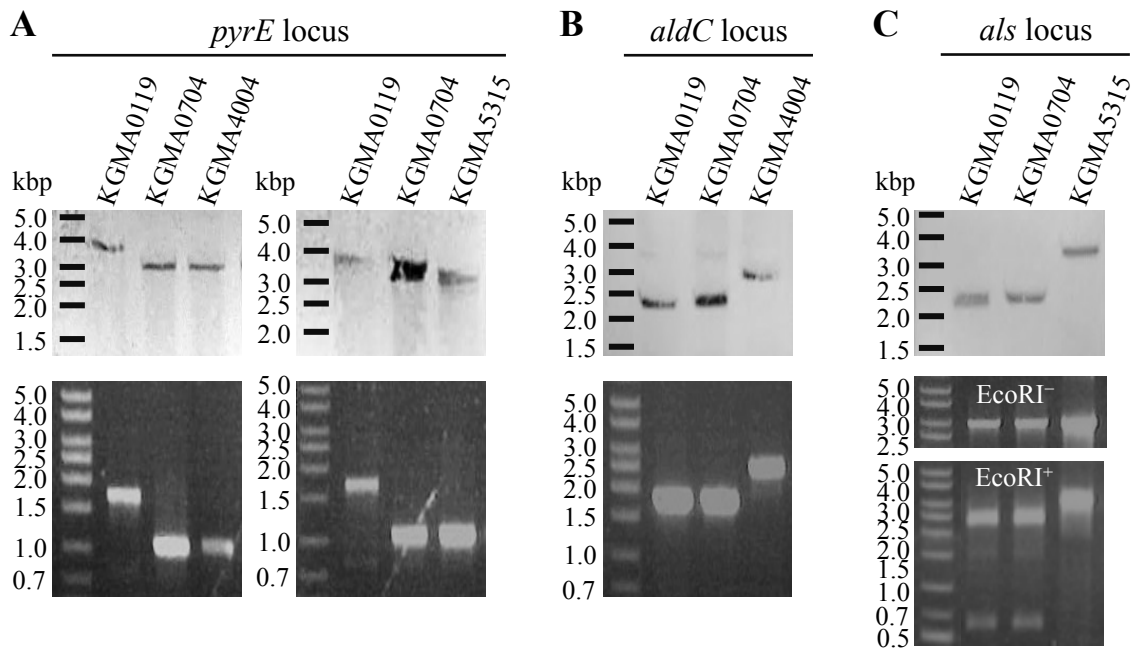


図3.7. *pyrE*欠失株, *aldC*破壊株, 及び*als*破壊株の遺伝子型同定. (上段) サザンブロット解析. KGMA0119株(野生株), KGMA0704株($\Delta pyrE$), KGMA4004株($\Delta pyrE \Delta aldC::pyrE$), 及び KGMA5315株($\Delta pyrE \Delta als::pyrE$)の染色体DNAをPvuII (A), 又はSmaI (B及びC)で消化した後, *pyrE* probe (図3.3参照) (A), 又は*aldC* probe (図3.6参照) (B及びC)を用いてサザンブロット解析を行った. (下段) PCR解析. 上記4株の染色体DNAを鋳型とし, 図3.3及び図3.6に示したプライマーを用いて, *pyrE*遺伝子座(A), *aldC*遺伝子座(B), 及び*als*遺伝子座(C)をPCR増幅した. *als*遺伝子座に関しては, 標的遺伝子破壊を確認するため, 得られたPCR産物をEcoRIで消化した. 用いたプローブ, 及びプライマーの位置は図3.3及び図3.6に示した.

aldC 破壊株及び *als* 破壊株のアセトイン生産能

KGMA0119 株, KGMA4004 株, 及び KGMA5315 株を, L-乳酸ナトリウムを添加した YPD 培地で培養し, 培養液中の揮発性成分を GC により定量した. 上記 3 株はほぼ同様の生育特性を示した(図 3.8A). また, エタノール酸化能(酢酸生産能)に関しても, 3 株間で明瞭な差異は観察されなかった(図 3.8D 及び E). 一方で, KGMA4004 株のアセトイン生産能は顕著に低下しており, 34 時間の培養で, 野生株 KGMA0119 株が 0.042%のアセトインを蓄積したのに対し(図 3.8B 及び 3.9B), KGMA4004 株は 0.009%であった(図 3.8B 及び 3.9C). KGMA4004 株は対数期後期から定常期初期にかけて微量

のジアセチルを蓄積したが、定常期後期では検出されなかった(図 3.8C 及び 3.9C). 続いて、実際の食酢製造条件下におけるアセトイン生産能を検証するため、KGMA0119 株及び KGMA4004 株を、0.3% L-乳酸ナトリウムを添加したもろみ(日本酒と食酢の混合物)に接種し、ジャーファーメンターを用いて培養した. その結果、YPD 培地における培養時と同様に、KGMA4004 株のアセトイン蓄積量は、KGMA0119 株と比較して著しく低下していた(KGMA0119 株, 0.074%; KGMA4004 株, 0.024%). 対照的に、*als* 破壊株である KGMA5315 株は予想に反して、野生株とほぼ同程度のアセトインを培養液中に蓄積した(KGMA0119 株, 0.042%; KGMA5315 株, 0.037%) (図 3.8B 及び 3.9D).

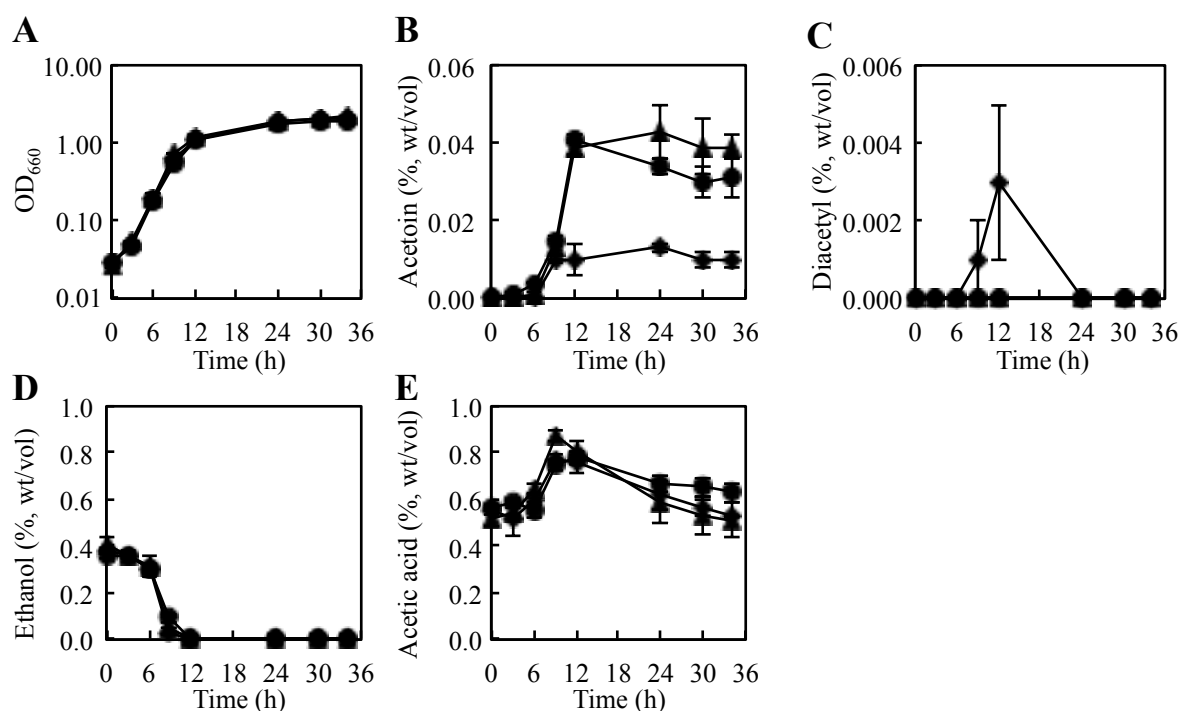


図3.8. *aldC*破壊株及び*als*破壊株の生育特性及び揮発性成分生産能解析. KGMA0119株(野生株), KGMA4004株($\Delta pyrE \Delta aldC::pyrE$), 及びKGMA5315株($\Delta pyrE \Delta als::pyrE$)を0.3% L-乳酸ナトリウムを含むYPD培地で培養し、培養液中に蓄積した揮発性成分をGCにより定量した. (A) OD_{660} . (B) アセトイン(% wt/vol). (C) ジアセチル(% wt/vol). (D) エタノール(% wt/vol). (E) 酢酸(% wt/vol). 三角, KGMA0119株; ダイヤモンド, KGMA4004株; 丸, KGMA5315株. エラーバーは標準偏差を表す($N=3$).

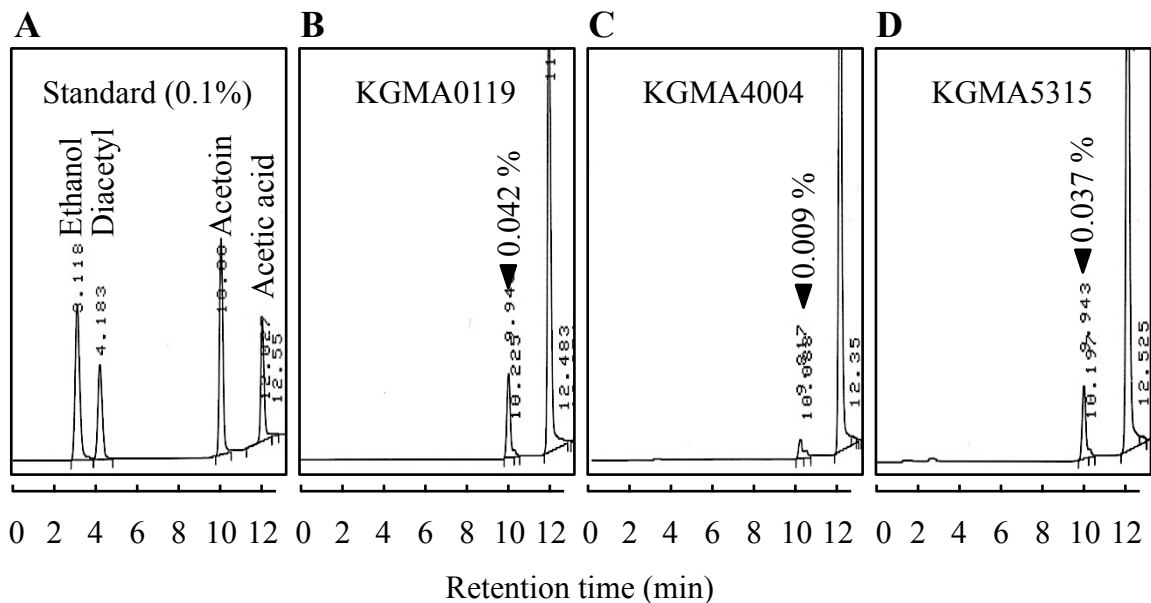


図3.9. *aldC*破壊株及び*als*破壊株培養液に蓄積した揮発性成分のガスクロマトグラム. KGMA0119株(野生株), KGMA4004株($\Delta pyrE \Delta aldC::pyrE$), 及びKGMA5315株($\Delta pyrE \Delta als::pyrE$)を0.3% L-乳酸ナトリウムを含むYPD培地で34時間培養し(図3.8参照), 培養液中に蓄積した揮発性成分をGCにより定量した. (A) 標準(全て0.1% [wt/vol]). (B) KGMA0119株. (C) KGMA4004株. (D) KGMA5315株.

第4節 考察

発酵食品の香味は、発酵工程に関与する様々な微生物により生産させる低分子化合物(アルコール, アルデヒド, 短鎖有機酸, 及びエステル)によって大きく影響される(24, 25). そのため, それら化合物存在比の僅かな違いが種々の発酵食品に固有の香味を与える(26). 従って, ヒトにとって好ましい香味を有する発酵食品の開発のためには, 発酵に関与する微生物の代謝コントロールが重要な課題の一つと言える. 一般に, 食品製造上有用な表現型を持つ微生物を育種する際には, 薬剤によるランダム変異の導入, 及びそれに続くスクリーニングが現在でも広く採用されている. しかしながら, 適切かつ合理的な選抜法の設計が困難な場合も多く, 目的の表現型を有する微生物の単離には多大な時間と労力を要する場合が少なくない. また, 薬剤処理の際に, 望ま

しくない無数の変異がゲノム中に蓄積するため、往々にしてその微生物が元来持つ頑健さ(robustness)が失われる。頑健さの喪失は生産性に大きく影響するため、有用菌株の育種にはより合理的な代謝デザインが必須である。それらを解決するため、本章では、ウラシル要求性を指標とした *K. europaeus* における遺伝子破壊技術を確立した。これにより、*K. europaeus* 代謝改変のための技術基盤を構築出来た。更に、本技術は選抜マーカーとして内在性遺伝子を用いている点、及び化学的に合成された DNA(PCR産物)の導入でも遺伝子破壊が可能である点から、得られた遺伝子破壊株は法的に定義された「遺伝子組換え体」には該当しないものと考えられる。従って、従来までの異種生物由来抗生物質耐性遺伝子を用いる手法とは一線を画すものであり、将来的な工業生産への応用も期待出来るであろう。実際に、類似のセルフクローニング法により作出された清酒酵母の、日本酒生産への応用例も報告されている(27)。

本章において確立した遺伝子破壊技術の有効性を検証するため、食酢における不快醸造香アセトインの生成に関与する *aldC* 又は *als* 遺伝子を破壊した株を構築した。*aldC* 破壊株 KGMA4004 株のアセトイン生産能は、野生株 KGMA0119 株と比較して著しく低下していた(図 3.8 及び 3.9)。その一方で、KGMA4004 株は野生株と同等の生育を示し、また、食酢製造において最も重要な形質であるエタノール酸化能にも差異は見られなかった(図 3.8)。KGMA4004 株は一時的に極微量のジアセチルを蓄積したが、定常期以降の蓄積は見られなかった(図 3.8C 及び 3.9C)。これは、生成したジアセチルがジアセチルレダクターゼにより、アセトインへ転換されたためと考えられる(図 3.5A)。従って、KGMA4004 株を用いる事で、不快醸造香のみが低減された食酢の製造が可能であると考えられる。一方、*aldC* 破壊株と同様に、アセトイン生産性の低下が期待された *als* 破壊株 KGMA5315 株は、予想に反して野生株とほぼ同等のアセトインを培養液中に蓄積した(図 3.8C 及び 3.9D)。図 3.5A に示した通り、*K. europaeus* を含め多くのバクテリアは、ALS に加え、ピルビン酸から α -アセト乳酸を合成する酵素として AHAS(BCAA 生合成における律速酵素)を持つ。ALS 及び AHAS は生理学的に異な

る機能を有するが、他の微生物において、AHAS がオーバーフロー代謝にも寄与する事が知られている(28). KGMA5315 株が野生株と同等のアセトイン生産性を示したのは、この様な AHAS の二次的な機能によるものと考えられる。

本章において確立した技術により任意の遺伝子破壊が可能となったが、これに加えて、微生物の遺伝子改変にはプラスミドの利用が極めて効果的である。類縁酢酸菌において多数の潜在型プラスミドが単離・同定されており(20, 29, 30), そのいくつかを基とした組換えプラスミドが酢酸菌研究における遺伝学ツールとして利用されている(31, 32). 次章において、*K. europaeus* の持つ潜在型プラスミドの単離、及びそれを基とした大腸菌、*K. europaeus*, 及び他属酢酸菌間におけるシャトルプラスミドの構築に関して詳述した。

第 5 節 要約

Komagataeibacter europaeus は食酢の工業生産において広く用いられる酢酸菌である。しかしながら、その産業上の重要性にも関わらず、遺伝子破壊技術を含めた、同酢酸菌の分子遺伝学的・生化学的解析に関する報告は限られており、多くの側面が未解明のままであった。これを踏まえ、*K. europaeus* におけるウラシル要求性を指標とした遺伝子破壊技術の構築を試みた。ピリミジン生合成遺伝子の一つであるオロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(*pyrE*)に着目し、ウラシル要求性及び 5-フルオロオロト酸耐性を指標に、野生株 KGMA0119 株より *pyrE* 遺伝子を欠失させた株を作出した。得られた *pyrE* 欠失株を KGMA0704 株($\Delta pyrE$)とし、同株及び *pyrE* 遺伝子を、それぞれ遺伝子破壊実験における宿主及び選抜マーカー遺伝子とした。被破壊遺伝子として、食酢の不快臭アセトインの合成に関与する α -アセト乳酸デカルボキシラーゼ遺伝子(*aldC*)及び α -アセト乳酸シンターゼ遺伝子(*als*)を標的とした。エレクトロポレーション法によって、遺伝子破壊ベクターを KGMA0704 株に導入し、標的遺伝子が

pyrE 遺伝子と置換された株を、ウラシル原栄養性を指標に選抜した。得られた *aldC* 破壊株及び *als* 破壊株を、それぞれ KGMA4004 株 ($\Delta pyrE \Delta aldC::pyrE$) 及び KGMA5315 株 ($\Delta pyrE \Delta als::pyrE$) とした。両株を富栄養培地で培養し、培養液中に蓄積したアセトインをガスクロマトグラフィーにより定量した。KGMA4004 株のアセトイン生産能は野生株と比較して顕著に低下していた (KGMA0119 株, 0.042%; KGMA4004 株 0.009%)。一方, KGMA5315 株は予想に反し, 野生株とほぼ同等のアセトイン (0.037%) を蓄積した。これらの結果より, 食酢不快臭アセトインの低減には, *aldC* 遺伝子の破壊が効果的である事が示された。本章の研究において確立された遺伝子破壊技術は, *K. europaeus* の代謝改変を行う上で極めて有益である。

引用文献

1. **Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR.** 1987. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* **154**:164-175.
2. **Galvão TC, de Lorenzo V.** 2005. Adaptation of the yeast *URA3* selection system to gram-negative bacteria and generation of a $\Delta betCDE$ *Pseudomonas putida* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:883-892.
3. **Yano T, Sanders C, Catalano J, Daldal F.** 2005. *sacB*-5-Fluoroorotic acid-*pyrE*-based bidirectional selection for integration of unmarked alleles into the chromosome of *Rhodobacter capsulatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3014-3024.
4. **Sato T, Fukui T, Atomi H, Imanaka T.** 2003. Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Bacteriol.* **185**:210-220.
5. **Sato T, Fukui T, Atomi H, Imanaka T.** 2005. Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3889-3899.
6. **Okada K, Hidese R, Fukuda W, Niitsu M, Takao K, Horai Y, Umezawa N, Higuchi T, Oshima T, Yoshikawa Y, Imanaka T, Fujiwara S.** 2014. Identification of a novel aminopropyltransferase involved in the synthesis of branched-chain polyamines in hyperthermophiles. *J. Bacteriol.* **196**:1866-1876.
7. **Hidese R, Inoue T, Imanaka T, Fujiwara S.** 2014. Cysteine desulphurase plays an important role in environmental adaptation of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Mol. Microbiol.* **93**:331-345.
8. **Goupil N, Corthier G, Ehrlich SD, Renault P.** 1996. Imbalance of leucine flux in *Lactococcus lactis* and its use for the isolation of diacetyl-overproducing strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2636-2640.

9. **Huang M, Oppermann-Sanio FB, Steinbüchel A.** 1999. Biochemical and molecular characterization of the *Bacillus subtilis* acetoin catabolic pathway. *J. Bacteriol.* **181**:3837-3841.
10. **Frädrich C, March A, Fiege K, Hartmann A, Jahn D, Härtig E.** 2012. The transcription factor AlsR binds and regulates the promoter of the *alsSD* operon responsible for acetoin formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **194**:1100-1112.
11. **Kisumi M, Komatsubara S, Chibata I.** 1971. Valine accumulation by α -aminobutyric acid-resistant mutants of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **106**:493-499.
12. **el-Mansi EM, Holms WH.** 1989. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.* **135**:2875-2883.
13. **Renna MC, Najimudin N, Winik LR, Zahler SA.** 1993. Regulation of the *Bacillus subtilis* *alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *J. Bacteriol.* **175**:3863-3875.
14. **De Ley J.** 1959. On the formation of acetoin by *Acetobacter*. *J. Gen. Microbiol.* **21**:352-365.
15. **Asai T.** 1968. Acetic acid bacteria: Classification and biochemical activities. University of Tokyo Press. Tokyo.
16. 赤坂直紀, 佐古田久雄, 藤原伸介. 2012. 酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* による分岐鎖アミノ酸の生産. *生物工学会誌* **90**:374-380.
17. **Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
18. **Green MR, Sambrook JF.** 2012. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
19. **Andrés-Barrao C, Falquet L, Calderon-Copete SP, Descombes P, Ortega Pérez R,**

- Barja F.** 2011. Genome sequences of the high-acetic acid-resistant bacteria *Gluconacetobacter europaeus* LMG 18890^T and *G. europaeus* LMG 18494 (reference strains), *G. europaeus* 5P3, and *Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2 (isolated from vinegar). *J. Bacteriol.* **193**:2670-2671.
20. **Ogino H, Azuma Y, Hosoyama A, Nakazawa H, Matsutani M, Hasegawa A, Otsuyama K, Matsushita K, Fujita N, Shirai M.** 2011. Complete genome sequence of NBRC 3288, a unique cellulose-nonproducing strain of *Gluconacetobacter xylinus* isolated from vinegar. *J. Bacteriol.* **193**:6997-6998.
21. **Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
22. **Bolívar F, Rodríguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Croso JH, Falkow S.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.
23. **Shigematsu T, Takamine K, Kitazato M, Morita T, Naritomi T, Morimura S, Kida K.** 2005. Cellulose production from glucose using a glucose dehydrogenase gene (*gdh*)-deficient mutant of *Gluconacetobacter xylinus* and its use for bioconversion of sweet potato pulp. *J. Biosci. Bioeng.* **99**:415-422.
24. **Romagnoli G, Luttk MA, Kötter P, Pronk JT, Daran JM.** 2012. Substrate specificity of thiamine pyrophosphate-dependent 2-oxo-acid decarboxylases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:7538-7548.
25. **Swiegers JH, Pretorius IS.** 2005. Yeast modulation of wine flavor. *Adv. Appl. Microbiol.* **57**:131-175.
26. **Hazelwood LA, Daran JM, van Maris AJ, Pronk JT, Dickinson JR.** 2008. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces*

- cerevisiae* metabolism. Appl. Environ. Microbiol. **74**:2259-2266.
27. **Hirosawa I, Aritomi K, Hoshida H, Kashiwagi S, Nishizawa Y, Akada R.** 2004. Construction of a self-cloning sake yeast that overexpresses alcohol acetyltransferase gene by a two-step gene replacement protocol. Appl. Microbiol. Biotechnol. **65**:68-73.
 28. **Shivers RP, Dineen SS, Sonenshein AL.** 2006. Positive regulation of *Bacillus subtilis* *ackA* by CodY and CcpA: establishing a potential hierarchy in carbon flow. Mol. Microbiol. **62**:811-822.
 29. **Azuma Y, Hosoyama A, Matsutani M, Furuya N, Horikawa H, Harada T, Hirakawa H, Kuhara S, Matsushita K, Fujita N, Shirai M.** 2009. Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. Nucleic Acids Res. **37**:5768-5783.
 30. **Prust C, Hoffmeister M, Liesegang H, Wiezer A, Fricke WF, Ehrenreich A, Gottschalk G, Deppenmeier U.** 2005. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. Nat. Biotechnol. **23**:195-200.
 31. **Okumura H, Uozumi T, Beppu T.** 1985. Construction of plasmid vectors and a genetic transformation system for *Acetobacter aceti*. Agric. Biol. Chem. **49**:1011-1017.
 32. **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.

第4章

潜在型プラスミドを利用した遺伝子改変技術の構築

第1節 緒言

細菌のプラスミドは非染色体性の環状二本鎖DNAであり、染色体DNAとは独立して自律的に複製する。また、外来遺伝子を宿主細胞に伝搬する事で、細菌集団内での遺伝的交雑や、宿主の進化を促進する。これまでに、宿主及びプラスミド間の相利共生関係を明らかにするため、様々な微生物種における両者の相互作用が研究されてきた(1)。一般にプラスミドは、特定の生育環境下において有益な表現型(抗生物質耐性、病原性、特異的な代謝経路等)を宿主に提供する事で、共生関係を構築する。宿主細胞はプラスミドを保持する事により、特定環境下における利益を享受する一方で、プラスミドにコードされる遺伝子の発現、及びプラスミドの複製には余分なエネルギーが必要なため、宿主の生育・代謝に対して負荷となりうる(1-3)。この代謝負荷を最小限にとどめ宿主と共生するため、一般にプラスミドは自己のコピー数(plasmid copy number, PCN)を低い状態で維持する機構を備えている(2, 4, 5)。一般にPCNは、一細胞当たりのプラスミドコピー数として定義されており(5)、プラスミドにコードされる制御タンパク質やRNAによりコントロールされる(2, 6)。近年の解析によれば、宿主の増殖速度もPCNを制御する上で非常に重要な因子である事が報告されている(7, 8)。また、一部の *Bacillus* 属細菌において、プラスミドのコピー数が生育段階に依存して変動するという興味深い報告もなされている(9, 10)。しかしながら、モデル微生物のプラスミドを中心にその機能の一端が明らかにされている一方で、宿主生存戦略における潜在型プラスミドの重要性は依然不明な場合が多い(11)。

酢酸菌のプラスミドに着目すると、*Acetobacter* 属酢酸菌を中心に、これまでに複数のプラスミドが単離・同定されている(12, 13)。それらを基とした組換えプラスミドも構築され、遺伝学ツールとして利用されている(14)。また、近年のゲノム解析の結果、

種々の酢酸菌が多数の潜在型プラスミドを保持する事が明らかにされた(15-18). 酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* は, 食酢の工業生産において広く用いられている産業上極めて重要な微生物である. しかしながら, その認識にも関わらず, 分子遺伝学的・生化学的解析に関する研究は限られている. 近年, タイプ株 LMG 18890^T 株のドラフトゲノム配列が決定され(19), また第 3 章で詳述した通り, ウラシル要求性を指標とした遺伝子破壊技術が確立されたが(20), *K. europaeus* の潜在型プラスミド, 及びそれらを用いた遺伝子改変技術に関する報告も, 上記同様極めて少ない(21). 有用菌株の育種には, 遺伝子破壊技術に加え, プラスミドを用いた遺伝子改変技術が有効かつ必須である.

上記を踏まえ, 本章では *K. europaeus* から潜在型プラスミドを単離し, PCN を含めたそれらの詳細な特徴付けを行った. 次に, 得られた潜在型プラスミドと大腸菌由来プラスミドを連結する事で, 大腸菌, *K. europaeus*, 及び他属酢酸菌細胞内で複製可能なシャトルプラスミドの構築を試みた.

第 2 節 実験材料及び方法

供試菌株及び培地

本章において供試した菌株及びプラスミドを表 4.1 に記載した. *K. europaeus* 及び *Acetobacter pasteurianus* の培養には, yeast-peptone-dextrose (YPD)培地(22)を用いた. 培養は全て 30°C で行い, 液体培養の際は往復振盪 150 rpm で行った. 特に明記しない限り, 培地に 0.4% (wt/vol)エタノール及び 0.5% (wt/vol)酢酸を加えて培養を行った. 固形培地での培養の際は, YPD 培地に 9 g/l の寒天を加えたものを用いた. 組換えシャトルプラスミド保持株の選抜の際には, YPD 培地に 50 µg/ml アンピシリン(シグマ・アルドリッチ社, アメリカ合衆国)を添加して培養を行った. *K. europaeus* 潜在型プラスミド制限断片のクローニング, 及びシャトルプラスミドの構築には, 大腸菌 DH5α株

(タカラバイオ, 滋賀) (23)及びプラスミド pBR322 (24)を用いた. DH5 α 株の培養には 50 μ g/ml アンピシリンを添加した Lysogeny broth (LB 培地) (25)を用い, 37°C で培養した.

表4.1. 供試菌株及びプラスミド

株・プラスミド	特徴	出典
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	23
<i>K. europaeus</i>		
KGMA0119株	食酢発酵液より単離(野生株)	22
KGMA0119 (pBE2)株	KGMA0119株由来pBE2保持株(Amp ^r)	本研究
KGMA0119 (pBE3)株	KGMA0119株由来pBE3保持株(Amp ^r)	本研究
<i>A. pasteurianus</i>		
KGMA0054株	食酢発酵液より単離(野生株)	本研究
KGMA0054 (pBE2)株	KGMA0054株由来pBE2保持株(Amp ^r)	本研究
KGMA0054 (pBE3)株	KGMA0054株由来pBE3保持株(Amp ^r)	本研究
プラスミド		
pBR322	Amp ^r	24
pGE1	KGMA0119株由来潜在型プラスミド(2,524 bp)	本研究
pGE2	KGMA0119株由来潜在型プラスミド(7,187 bp)	本研究
pGE3	KGMA0119株由来潜在型プラスミド(5,537 bp)	本研究
pBE2	pGE2全長及びpBR322全長を連結した組換えシャトルプラスミド(Amp ^r , 11,548 bp)	本研究
pBE3	pGE3全長及びpBR322全長を連結した組換えシャトルプラスミド(Amp ^r , 9,898 bp)	本研究

DNA 操作及びシーケンス解析

一般的な DNA 操作に関する手法は既報(25)に準拠した。PCR の際の DNA ポリメラーゼとして、KOD plus (東洋紡, 大阪)を用いた。PCR プライマーは、タイプ株 LMG 18890^T 株のドラフトゲノム配列を基に設計した。制限酵素及び各種修飾酵素は、タカラバイオ又はニッポン・ジーン(東京)より購入した。アガロースゲル電気泳動後の標的 DNA の精製には、NucleoSpin Gel and PCR Cleanup Kit (タカラバイオ)を用いた。プラスミド DNA の抽出は、アルカリ抽出法(25)又は Plasmid Midi Kit (キアゲン社, ドイツ)を用いて行った。DNA シーケンス解析は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 及び Model 3130 Capillary Sequencer (共にアプライド・バイオシステムズ社, アメリカ合衆国)を用いて行った。

潜在型プラスミドの抽出

K. europaeus KGMA0119 株(野生株)を 5 ml YPD 培地で 16 時間培養した。その 1 ml を 30 ml YPD 培地に接種し、24 時間培養した。続いて、その全量を 3 L YPD 培地に接種し、容量 5 L のジャーファーメンター(MDL-501, 丸菱バイオエンジニアリング, 東京)を用いて更に 24 時間培養した(30°C, 500 rpm, 通気量 1 L/分)。1 L の培養液から、遠心分離(4°C, 10,000 × g, 10 分)により菌体を回収し、粗プラスミド DNA をアルカリ抽出法(25)により抽出した。得られた核酸沈殿物を 6 ml の TE₁₀₋₁ 緩衝液(10 mM Tris-HCl 及び 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid [EDTA], pH8.0)に溶解した。続いて、以下に示した塩化セシウム密度勾配遠心法により、潜在型プラスミドを分画した。6 ml 粗プラスミド DNA 溶液に、塩化セシウム及びエチジウムブロマイドを、終濃度がそれぞれ 6.0 M 及び 0.5 mg/ml となる様添加し、37°C で 10 分間保温する事で十分に溶解させた。その後、20°C, 268,000 × g で 16 時間遠心分離を行った(Ultracentrifuge Model CP 100MX 及び P65A ローター, 日立工機, 東京)。潜在型プラスミドを含む画分を回収し、水飽和 *n*-ブタノールを用いて画分に含まれるエチジウムブロマイドを除去した。その後、

TE_{10-0.1} 緩衝液(10 mM Tris-HCl 及び 0.1 mM EDTA, pH8.0)に対して透析を行い、プラスミド画分中の塩化セシウムを除去した。得られた潜在型プラスミドの純度及び品質は、260 nm 及び 280 nm における吸光度(optical density, OD)の測定、及びアガロースゲル電気泳動により確認した。

潜在型プラスミドの特徴付け

KGMA0119 株より得られた潜在型プラスミドを HindIII, ClaI, SphI, SmaI, PvuII, EcoRI, PstI, 又は KpnI で消化し(図 4.1), プラスミドの構造解析を行った。HindIII, ClaI, 及び SphI 消化により得られた制限断片を pBR322 へクローニングし、それらのシーケンス解析を行った。得られたシーケンスデータを基にアセンブルを行い、最終的に 3 種の潜在型プラスミドの完全配列を決定した。各々を、pGE1 (2,524 bp), pGE2 (7,187 bp), 及び pGE3 (5,537 bp)とした(図 4.2)。各プラスミドにコードされる遺伝子の翻訳領域 (open reading frame, ORF) は、解析プログラム ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)及び Glimmer (26)を用いて予測した。更に、実際に機能すると考えられる遺伝子を、開始コドン上流に位置する Shine-Dalgarno (SD)配列を指標として選抜した。各遺伝子の特徴付け(アノテーション)は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列をクエリとした相同性検索(BLASTP)により行った(表 4.3)。

潜在型プラスミドの PCN 測定

KGMA0119 株を 5 ml YPD 培地で 16 時間培養し、その一部を 0.4% (wt/vol)エタノール及び 0.5% (wt/vol)酢酸, 3.2% (wt/vol)エタノール及び 0.5% (wt/vol)酢酸, 又は 0.4% (wt/vol)エタノール及び 1.0% (wt/vol)酢酸を添加した 30 ml YPD 培地に接種して更に培養を行った。この時、細胞密度(OD₆₆₀)が 0.03 となる様菌体を接種した。各培地における生育が対数期中期(OD₆₆₀ = 0.2), 定常期初期(OD₆₆₀ = 1.0), 及び定常期後期(OD₆₆₀ =

1.3–1.5)に到達した時点で、遠心分離(4°C, 10,000 × g, 5分)により菌体を回収した。既報(25)に従い、得られた菌体から全 DNA を抽出し、これを PCN 測定の際の鋳型として用いた(下記参照)。また、菌体回収の際に得られた培養液上清は、エタノール及び酢酸定量のため、ガスクロマトグラフィー(gas chromatography, GC)に供試した(下記参照)。

PCNは、一般に一細胞に含まれるプラスミドのコピー数として定義される(5)。本研究では、PCN をゲノムに対するプラスミドのコピー数と近似し、上記で抽出した全 DNA 中のゲノム数及び潜在型プラスミドのコピー数をリアルタイム定量 PCR で測定し、両者の値を比較する事で PCN を算出した。第 3 章において、 α -アセト乳酸デカルボキシラーゼ遺伝子(*aldC*)は *K. europaeus* ゲノム内で 1 コピーのみ存在する遺伝子である事が確認されているため(20)、全 DNA サンプル中の *aldC* コピー数を測定する事でゲノム数を推定した。リアルタイム定量 PCR は、SuperScript III RT/Platinum Kit (インビトロジェン社, アメリカ合衆国)及び ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (アプライド・バイオシステムズ社)を用いて行った。検量線作成のため、*aldC* 遺伝子及び潜在型プラスミド内の標的領域を、KGMA0119 株全 DNA を鋳型とした PCR により増幅した。その際用いたプライマーを表 4.2 に記載した(pGE1, pGE1-q-Fw – pGE1-q-Rv; pGE2, pGE2-q-Fw – pGE2-q-Rv; pGE3, pGE3-q-Fw – pGE3-q-Rv; *aldC*, *aldC*-Fw – *aldC*-Rv)。得られた PCR 産物 100, 10, 1, 0.1, 及び 0.01 pg を用い、*aldC* 及び潜在型プラスミドに特異的な検量線を作成した。上記種々の培養条件及び生育段階で抽出した全 DNA 1 ng を鋳型としてリアルタイム定量 PCR を行い、供試した鋳型サンプル中の *aldC* 及び潜在型プラスミドのコピー数を定量した。PCR 反応が特異的に行われた事を確認するため、PCR 終了後に融解曲線分析を行った。手順はメーカーのプロトコールに準拠した。検量線より推定された標的 DNA の量(g)から、下記計算式を用いてコピー数(mol)を算出した。

[DNA 量(g)]/[標的配列の長さ(bp) × 660* (g/mol/bp)]

*DNA 塩基対の平均分子量

更に、得られたコピー数(mol)を基に、下記計算式により PCN を算出した。

[潜在型プラスミド(mol)]/[aldC (mol)]

表4.2. プライマー

プライマー	配列 (5' - 3')	目的
322-F	TATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG	遺伝子型同定
pGE2-R1	TGGCATCATTCACTCCTGACGTG	遺伝子型同定
pGE3-R1	CAACACGTTCCAAGTTTCCAG	遺伝子型同定
H2-F	CTCCTTGGCCTGTTGCTGAACTTC	遺伝子型同定
H2-R	CAAACCTCGCAGAGTTTGCATAAG	遺伝子型同定
H3-F	GTCTCAAGCGAGATATTC	遺伝子型同定
H3-R	GTTCCAAGTTTCCAGCATC	遺伝子型同定
pGE1-q-Fw	TTGCATCTGTCCCTACCCTACC	プラスミドコピー数測定
pGE1-q-Rv	GGGAATACTGGCTCATCGTCTC	プラスミドコピー数測定
pGE2-q-Fw	TGACTGTTTGGCATCACGTAAG	プラスミドコピー数測定
pGE2-q-Rv	CATCACAAGAAGTCGGCAAAAAG	プラスミドコピー数測定
pGE3-q-Fw	CCTTGCGGTATCTGCCTTTC	プラスミドコピー数測定
pGE3-q-Rv	ATGACTGGGAGCGGTTTGAG	プラスミドコピー数測定
aldC-Fw	ATGCTATTCGGTAGGCGATG	プラスミドコピー数測定
aldC-Rv	AGTTCGTCAAGCGTGGTTTC	プラスミドコピー数測定
2P-F	GTATCCAAGGAAGGCCGAGA	サザンブロット解析
2P-R	CGGCAGACGATCATCAAGTC	サザンブロット解析
3P-F	GCCTCACGAGAGGGGAATCT	サザンブロット解析
3P-R	ACTCCACCTCTCACGCCAGT	サザンブロット解析

GCによるエタノール及び酢酸の定量

全 DNA 抽出の際に得られた培養液上清に含まれるエタノール及び酢酸は GC (GC-2014, 島津製作所, 京都)により定量した. 成分の分離にはパックド・カラム (polyethylene glycol 20M 10% ShinCarbon A 60/80 2.1 m × 3.2 mm, 信和化工, 京都)を用いた. カラム・オープンの温度は, 60°Cで3分間保持した後, 昇温速度 10°C/分で 200°Cまで上昇させた.

大腸菌及び酢酸菌で複製可能なシャトルプラスミドの構築

pGE2 及び pGE3 を HindIII 消化により直鎖状にし(図 4.1), 同様に HindIII によって直鎖化した pBR322 と連結した. 得られた組換えプラスミドを, それぞれ pBE2 (11,548 bp)及び pBE3 (9,898 bp)とした(図 4.4). 次に, pBE2 又は pBE3 をエレクトロポレーション法(20)により, *K. europaeus* KGMA0119株及び *A. pasteurianus* KGMA0054株 (野生株)に導入した. 細胞を, 1 ml YPD 培地に懸濁し, 3 時間培養した. 菌体を遠心分離(4°C, 6,000 × g, 5 分)により回収し, 生理食塩水(塩化ナトリウム 8.5 g/l)に再懸濁する事で洗浄した. 再度遠心分離により菌体を回収し, 少量の生理食塩水に懸濁した後, 50 µg/ml アンピシリンを添加した 5 ml YPD に接種した. アンピシリン耐性株を集積するため, 48 時間以上培養した. 培養液を生理食塩水で適宜希釈し, アンピシリンを添加した YPD 寒天培地に塗布した後, 30°Cで2-3日間保温した. 寒天上に生じたアンピシリン耐性コロニー(候補株)から全 DNA 又はプラスミド DNA を抽出し, それらを用いて, 候補株の遺伝子型を PCR 及びサザンブロット解析により同定した. すなわち, 全 DNA 又はプラスミド DNA を鋳型とし, pBE2 内の pBR322 及び pGE2 連結部(0.9 kb), 又は pBE3 内の pBR322 及び pGE3 連結部(0.6 kb)を, プライマーペア 322-F – pGE2-R1 又は 322-F – pGE3-R1 (図 4.4)を用いて PCR 増幅した. 続いて, pGE2 及び pGE3 の HindIII 認識配列を含む領域(共に 0.8 kb), 及び pBE2 及び pBE3 内の pBR322 全長を含む領域(共に 5.2 kb)を, プライマーペア H2-F – H2-R 及び H3-F – H3-R を用いて PCR 増

幅した(図 4.2 及び 4.4).

サザンブロット解析は, DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (ロシュ社, アメリカ合衆国)を用いて行った. KGMA0119 株及び KGMA0119 株由来アンピシリン耐性株から抽出した全 DNA 7 µg, 及び大腸菌より抽出・精製した組換えプラスミド(pBE2 及び pBE3) 2 µg を SphI で消化し, 制限断片を 1.0% (wt/vol)アガロースゲル電気泳動により分離した後, エレクトロブロットティング法(Trans-Blot Cell, バイオラット・ラボラトリーズ社) (25)によりナイロンメンブレン(Hybond-N+, GE 社, アメリカ合衆国)へ転写した. プローブとして, 図 4.2 及び 4.4 に示した pGE2 probe 及び pGE3 probe を用いた. 両プローブは, 2P-F – 2P-R 及び 3P-F – 3P-R のプライマーペア(表 4.2)を用い, KGMA0119 株プラスミド DNA から PCR 増幅した. 得られた PCR 産物をジゴキシゲニン(digoxigenin, DIG)-dUTP で標識し, 以降のハイブリダイゼーション反応(48°C, 16 時間)に供試した. ハイブリダイゼーションの手順は, メーカー推奨のプロトコールに準拠した.

上記実験より, 組換えプラスミドを持つ事が確認された株を, *K. europaeus* KGMA0119 (pBE2)株, KGMA0119 (pBE3)株, *A. pasteurianus* KGMA0054 (pBE2)株, 及び KGMA0054 (pBE3)株とした.

塩基配列のアクセッション番号

pGE1, pGE2, pGE3, 及び *A. pasteurianus* KGMA0054 株 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は, それぞれ AB972537, AB972538, AB972539, 及び AB979194 のアクセッション番号の下, データベース DDBJ, EMBL, 及び GenBank に登録された.

第3節 結果

潜在型プラスミドの単離と特徴付け

K. europaeus KGMA0119 株(野生株)より潜在型プラスミドを抽出した. 得られたプラスミドをアガロースゲル電気泳動により分離したところ, 閉環状プラスミドと考えられるシグナルが複数検出されたことから(図 4.1, レーン 2), KGMA0119 株は複数の潜在型プラスミドを保持する事が示唆された. 更に, プラスミドを HindIII, ClaI, SphI, SmaI, 又は PvuII で消化したところ, 用いた制限酵素に依存して, 長さの異なる種々の制限断片が得られた(図 4.1, レーン 3-7). 一方, EcoRI, PstI, 又は KpnI では, 潜在型プラスミドは消化されず, 制限酵素処理をしていない場合と比較して, 電気泳動パターンに顕著な差異は観察されなかった(図 4.1, レーン 8-10).

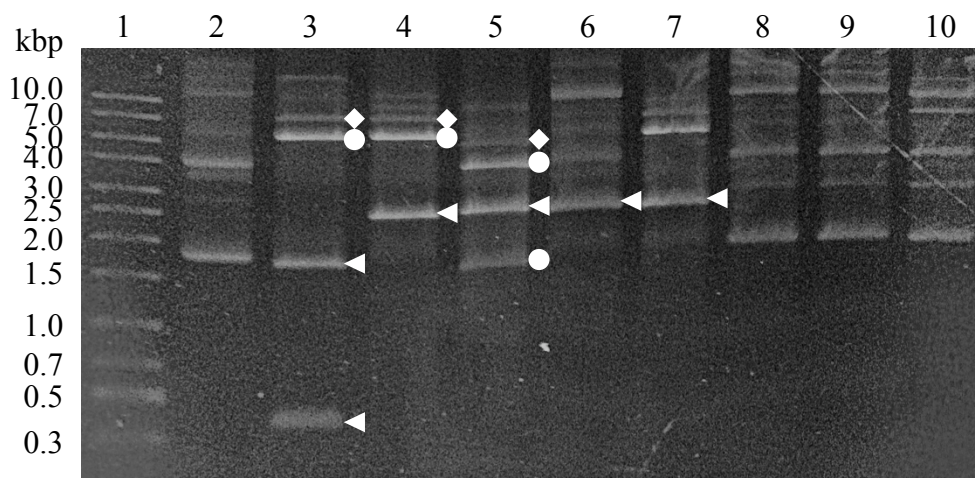


図4.1. 潜在型プラスミドの制限酵素による消化. KGMA0119株(野生株)より抽出した潜在型プラスミドを種々の制限酵素で消化した. レーン: 1, DNAサイズマーカー; 2, 抽出プラスミド; 3, HindIII; 4, ClaI; 5, SphI; 6, SmaI; 7, PvuII; 8, EcoRI; 9, PstI; 10, KpnI. pGE1, pGE2, 及びpGE3由来の制限断片を, それぞれ三角, ダイヤモンド, 及び丸で示した.

続いて, HindIII, ClaI, 及び SphI 消化により得られた制限断片を pBR322 にクローニングし, それらのシーケンス解析を行った. シーケンスデータをアセンブルする事で,

最終的に3種の潜在型プラスミドの完全配列を得た。各々を、pGE1 (2,524 bp), pGE2 (7,187 bp), 及び pGE3 (5,537 bp)とした(図 4.2)。潜在型プラスミドの GC 含量は、52% (pGE1), 51% (pGE2), 及び 55% (pGE3)であった。次に、プラスミド塩基配列をクエリとして相同性検索(BLASTN)を行ったところ、pGE1 は、これまでに単離・同定された酢酸菌由来のいかなるプラスミド、又は染色体 DNA(15-19, 21)とも顕著な相同性を示さなかった。他方、pGE2 及び pGE3 の一部領域(図 4.2B 及び C, 破線で示した領域 W, X, Y, 及び Z)は、以下に示す通り、酢酸菌由来のプラスミド又は染色体 DNA と非常に高い同一性を示した: W, *Komagataeibacter xylinus* のプラスミド pGX4 (CP004364) と 91%; X, *A. pasteurianus* のプラスミド Apa386Bp6 (HF677576) と 79%; Y, *Gluconacetobacter diazotrophicus* のプラスミド pGDIPal5I (AM889287) と 81%; Z, *K. xylinus* の染色体 DNA (CP004360)と 91%。解析プログラムを用いた ORF 予測の結果、pGE1, pGE2, 及び pGE3 は、それぞれ 3, 8, 及び 4 つの ORF を保持する事が明らかとなり(図 4.2), それらの開始コドン上流には SD 配列が検出された。各 ORF にコードされた推定タンパク質のアミノ酸配列をクエリとし、相同性検索(BLASTP)によるアノテーションを行った。それらと高い相同性を示したタンパク質を表 4.3 に記載した。相同性検索の結果、多くが機能未知タンパク質(hypothetical protein)であった(表 4.3)。一方、予測された ORF のいくつかは機能の明らかなタンパク質と相同性を示した。ORF1-1 及び 2-5 は、接合伝達を介した娘細胞へのプラスミド伝達を担う mobilization protein (Mob)をコードすると予測された(27)。以下に示した3つの ORF にコードされる推定タンパク質は、プラスミドの複製及び PCN 制御に関する replication initiator protein (Rep) (6)と高い同一性を示した: ORF2-4, *A. pasteurianus* の Rep (WP_003631006) と 47%; ORF2-8, *Acetobacter acetii* の Rep (YP_008411027)と 60%; ORF3-3, *Acetobacter pomorum* の Rep (WP_006115714)と 65%。ORF3-3 にコードされる推定タンパク質は、*K. europaeus* の Rep (RepB, WP_019087587) (4)とも高い同一性を示した。pGE1 からは、推定 *rep* 遺伝子は同定されなかった。ORF3-2 にコードされる推定タンパク質は、*K.*

xylinus のフェナジン生合成関連タンパク質(PhzF, AHI24732)と非常に高い同一性(94%)を示した。フェナジンは広範な抗菌スペクトルを示す抗生物質であり, PhzFはその生合成に関与している。*Pseudomonas* 属において機能解析が進んでいるが(28, 29), 他種微生物における PhzF の機能は未知である。ORF3-4 は, 転写因子 CopG (WP_003631008)をコードすると予測された。CopGは *repB* プロモーターに結合する事で, *repB* の転写を抑制する(4)。RepBはプラスミドの複製に関与するため, CopGは *repB* の転写調節を行う事で, PCNを制御する(4)。ORF2-3にコードされる推定タンパク質は, *K. europaeus* の killing-determinant protein (Kid)と非常に高い同一性(96%)を示した。KidはRNaseの一種であり, プラスミドを失った細胞内で mRNA を分解し, 翻訳を阻害する。これにより, プラスミドを持たない細胞は選択的に排除され, プラスミドが宿主細胞集団内で安定的に維持・伝達される(30, 31)。

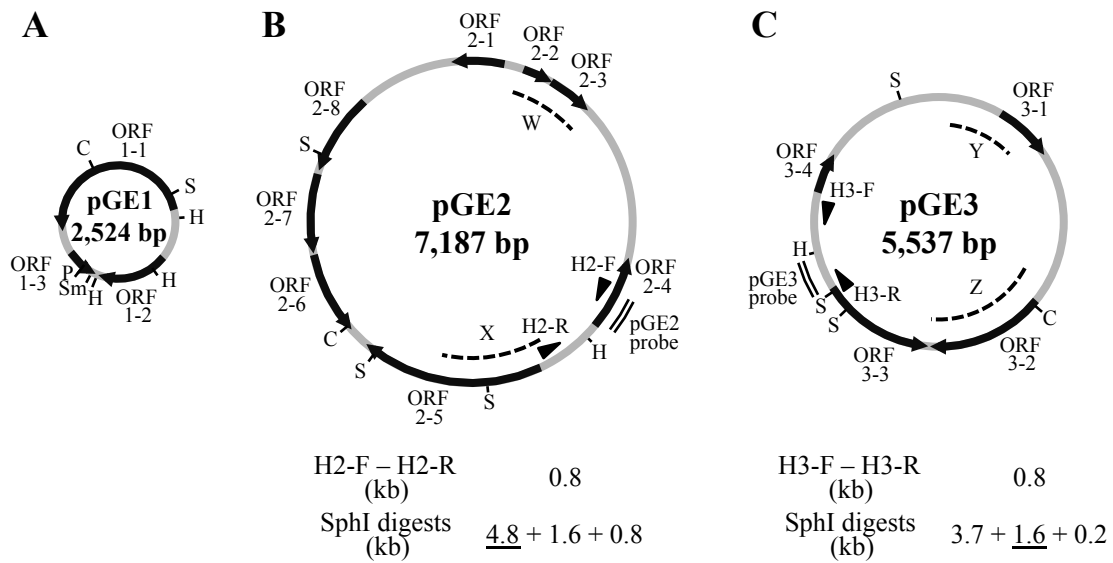


図4.2. KGMA0119株(野生株)より単離・同定された3種の潜在型プラスミド. (A) pGE1. (B) pGE2. (C) pGE3. (A, B, 及びC) 黒矢印は, 相同性検索により予測されたORFを示す(表4.3参照). (B及びC) 破線で示した領域W, X, Y, 及びZは, それぞれ*K. xylinus* E25株由来のプラスミドpGX4 (CP004364), *A. pasteurianus* 386B株由来のプラスミドApa386Bp6 (HF677576), *G. diazotrophicus* Pal5株由来のプラスミドpGDIPal5I (AM889287), 及び*K. xylinus* E25株染色体DNA(CP004360)と高い同一性を示した. 模式図中に, 遺伝子型同定に用いたPCRプライマー(黒三角), 及びサザンブロット解析に用いたプローブ(二重線)を示した(図4.6参照). 上記プライマーにより増幅されるPCR産物の長さ, 及びSphI消化により得られる制限断片の長さを, 模式図下部に示した. 更に, 上記プローブとのハイブリダイゼーションにより検出される制限断片を下線で強調した(図4.6参照). C, ClaI認識配列; H, HindIII認識配列; P, PvuII認識配列; S, SphI認識配列; Sm, SmaI認識配列.

表4.3. 相同性検索(BLASTP)による, 潜在型プラスミドにコードされる遺伝子の機能予測

クエリ	相同性のあるタンパク質				相同性			
	プラスミド ORF	アミノ酸残基数	Accession No.	微生物種	アノテーション ^a	アミノ酸残基数	同一性 (%)	類似性 (%)
pGE1	1-1	414	WP_006726261	<i>Agrobacterium albertimagni</i>	Mob	382	39	59
	1-2	170	GAJ28506	<i>Acidomonas methanolica</i>	Hypo	171	34	51
	1-3	77	WP_018433099	<i>Burkholderia</i> sp.	MP	478	39	57
pGE2	2-1	125	WP_019092408	<i>Komagataeibacter europaeus</i>	Hypo	125	96	96
	2-2	72	AHI27224	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	Hypo	72	89	95
	2-3	107	WP_019092698	<i>Komagataeibacter europaeus</i>	Kid	107	96	97
	2-4	182	WP_003631006	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Rep	162	47	65
	2-5	441	WP_003627465	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Mob	338	54	70
	2-6	197	WP_006117066	<i>Acetobacter pomorum</i>	Hypo	215	34	46
	2-7	182	WP_010669352	<i>Acetobacter aceti</i>	Hypo	185	42	58
	2-8	186	YP_008411027	<i>Acetobacter aceti</i>	Rep	181	60	77
pGE3	3-1	135	WP_023942379	<i>Gluconobacter frateurii</i>	Hypo	167	74	76
	3-2	280	AHI24732	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	PhzF	280	94	96
	3-3	265	WP_006115714	<i>Acetobacter pomorum</i>	Rep	287	65	80
	3-4	94	WP_003631008	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CopG	95	81	92

^a Mob, mobilization protein; Hypo, hypothetical protein; MP, membrane protein; Kid (killing-determinant), プラスミドを失った細胞の mRNA を分解する事で生育を阻害する RNase; Rep, replication initiator protein; PhzF, フェナジン(phenazine)合成遺伝子; CopG, rep 遺伝子の発現を抑制する転写因子.

リアルタイム定量 PCR による潜在型プラスミド PCN の測定

一般にプラスミドのコピー数は宿主代謝への負荷を最小限に抑制するため、低いレベルに維持される。 *K. europaeus* においてもこの事実が該当するかどうかを検証するため、KGMA0119 株を種々の培地条件で培養し、異なる生育段階における潜在型プラスミドの PCN を、リアルタイム定量 PCR により測定した。 0.4%エタノール及び 0.5%酢酸を添加した YPD 培地で培養すると、pGE1 のコピー数は対数期中期(7 コピー/ゲノム)から上昇し始め、定常期初期において最大値(12 コピー/ゲノム)に到達した(図 4.3A)。その後定常期後期において、最小値(4 コピー/ゲノム)まで減少した(図 4.3A)。 pGE2 及び pGE3 は全ての生育段階を通して低いレベル(1-3 コピー/ゲノム)に維持されていた(図 4.3A)。序論でも記述した通り、酢酸菌にとってエタノール及び酢酸はその生育にとって必須の栄養基質である。これら基質の濃度が潜在型プラスミドのコピー数に与える影響を検証した。初発エタノール濃度を 0.4%から 3.2%へ上昇させると、pGE1 コピー数の若干の低下が観察されたものの、3 種のプラスミドの PCN は、0.4%エタノール存在下で培養した時(図 4.3A)とほぼ同様の挙動を示した(図 4.3B)。対照的に、初発酢酸濃度を 0.5%から 1.0%へ上昇させると、pGE1 及び pGE3 の PCN 挙動において顕著な変化が観察された。 pGE1 の場合、0.5%酢酸存在下では、定常期初期においてそのコピー数が最大値に到達したのに対し、1.0%下では、そのピークが対数期中期へ遷移した(図 4.3C)。また pGE3 に関しては、0.5%下では PCN の変動が見られなかったのに対し(1-3 コピー/ゲノム)、1.0%下では対数期中期においてコピー数の上昇が見られた(6 コピー/ゲノム) (図 4.3C)。 pGE2 の PCN は、いずれの培地条件下においても、全ての生育段階を通して低いレベル(1-3 コピー/ゲノム)に維持されていた(図 4.3)。

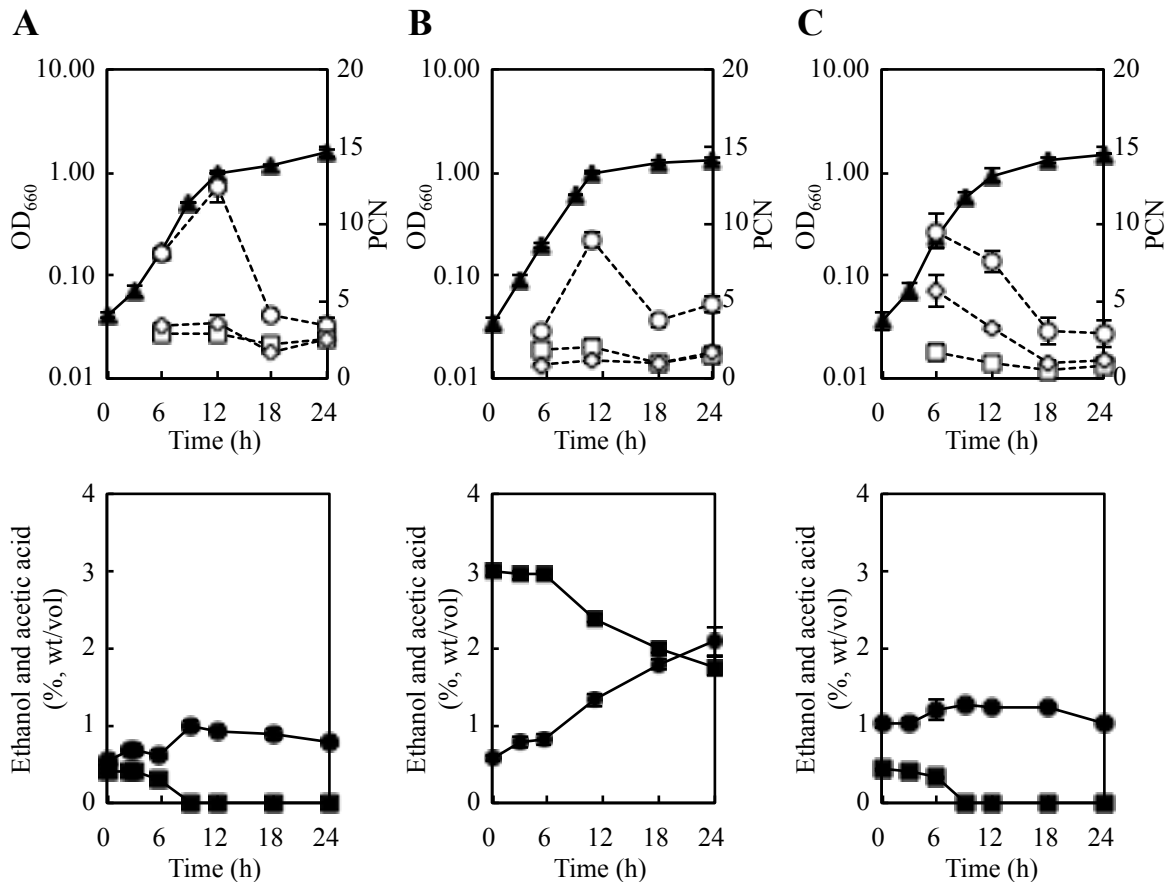


図4.3. 潜在型プラスミドのコピー数の変動. KGMA0119株(野生株)を, エタノール及び酢酸濃度の異なるYPD培地で培養し, 対数期, 定常期初期, 及び定常期における潜在型プラスミドのコピー数(plasmid copy number, PCN)をリアルタイム定量PCRにより測定した(上段). 併せて, 培地中のエタノール及び酢酸濃度をGCにより定量した(下段). (A) 0.4%エタノール及び0.5%酢酸. (B) 3.2%エタノール及び0.5%酢酸. (C) 0.4%エタノール及び1.0%酢酸. (上段) 黒三角, OD₆₆₀; 白丸, pGE1; 白四角, pGE2; 白ダイヤモンド, pGE3. (下段) 黒四角, エタノール(% wt/vol); 黒丸, 酢酸(% wt/vol). エラーバーは標準偏差を表す(N=3).

大腸菌及び酢酸菌で複製可能なシャトルプラスミドの構築

HindIII 消化により直鎖化した pGE2 又は pGE3 を, 同様に HindIII 消化により直鎖化した pBR322 と連結する事で, 2種の組換えプラスミド pBE2 及び pBE3 を構築した(図 4.4). pBE2 及び pBE3 は, 潜在型プラスミド(pGE2 及び pGE3)及び pBR322 の全長を含む.

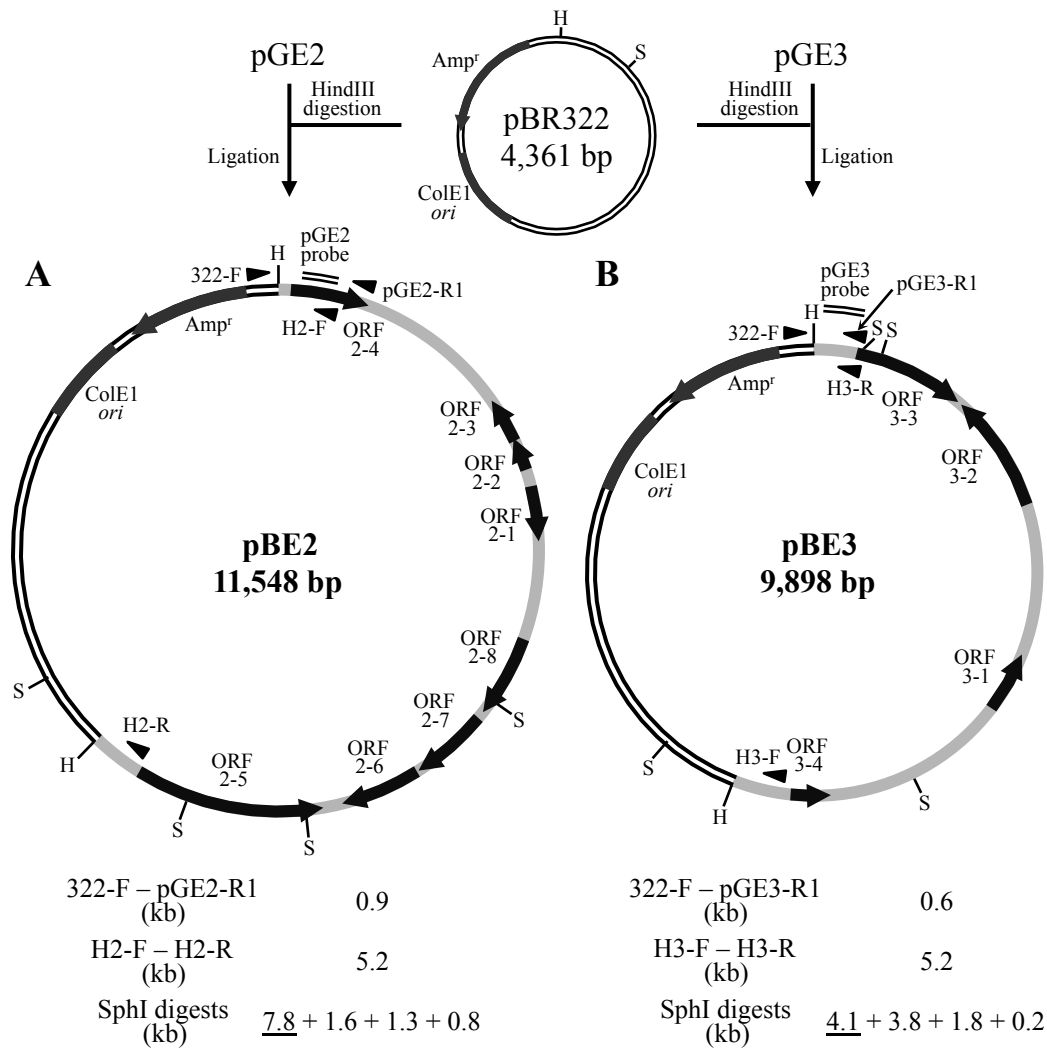


図4.4. シャトルプラスミドの構築. HindIII消化により得られた直鎖状pGE2又はpGE3と、pBR322のHindIII消化断片を連結する事で、2種の組換えプラスミドpBE2 (A)及びpBE3 (B)を構築した. 遺伝子型同定に用いたPCRプライマー、及びサザンブロット解析に用いたプローブを、それぞれ黒三角及び二重線で示した(図4.6及び4.7参照). 上記プライマーにより増幅されるPCR産物の長さ、及びSphI消化により得られる制限断片の長さを、模式図下部に示した. 更に、上記プローブとのハイブリダイゼーションにより検出される制限断片を下線で強調した(図4.6参照). H, HindIII認識配列; S, SphI認識配列.

これらを KGMA0119 株へ導入したところ、多数のアンピシリン耐性コロニーが得られた. それら耐性コロニーは pBE2 又は pBE3 を保持すると推測されたため、無作為に抽出したコロニーの一つを、それぞれ KGMA0119 (pBE2)株の候補及び KGMA0119 (pBE3)株の候補とした(図 4.5).

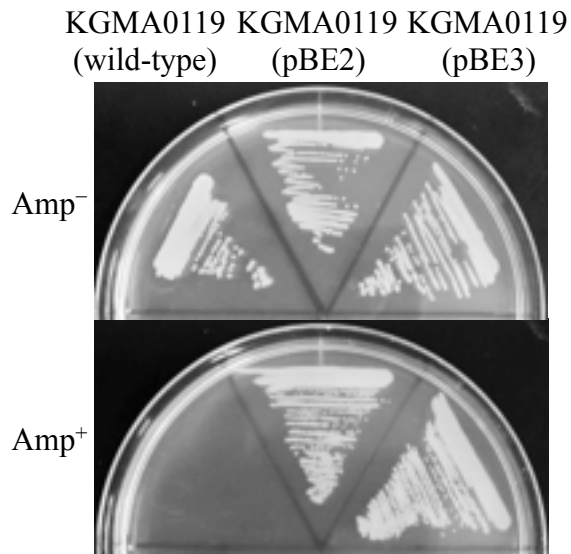


図4.5. 組換えプラスミドを保持する*K. europaeus*の抗生物質耐性. 2種の組換えプラスミドをKGMA0119株(野生株)へ導入する事で得られた, pBE2又はpBE3を細胞内に保持するKGMA0119 (pBE2)株又はKGMA0119 (pBE3)株を, 50 µg/ml アンピシリンを含まない(上段), 或いは含む(下段)YPD寒天培地に画線した. 左, KGMA0119株; 中央, KGMA0119 (pBE2)株; 右, KGMA0119 (pBE3)株.

両候補株の細胞内における組換えプラスミド存在の有無を, PCR により検証した. 初めに, 潜在型プラスミド及び pBR322 の連結部を標的とした PCR を行った(図 4.4). すなわち, プライマーペア 322-F – pGE2-R1 又は 322-F – pGE3-R1 を用いる事で, 組換えプラスミド pBE2 又は pBE3 を保持する場合のみ特異的 PCR 増幅が起こる(図 4.4). KGMA0119 株及び組換えプラスミドを保持すると推測された候補株(図 4.5)から抽出したプラスミド, 及び大腸菌から抽出した pBE2, pBE3, 及び pBR322 を鋳型として PCR を行った結果, pBE2 及び pBE3, 及び図 4.5 で示した 2 つの候補株由来のプラスミドからのみ標的領域が PCR 増幅された(図 4.6, 上段). 一方, KGMA0119 株プラスミド及び pBR322 からは, PCR 増幅は起こらなかった(図 4.6, 上段). 次に, pGE2 及び pGE3 中に一カ所のみ存在する, HindIII 認識配列を含む領域を標的としたプライマーペア H2-F – H2-R 及び H3-F – H3-R (図 4.2B 及び C)を設計し, PCR を行った. 潜在型プラスミドからは 0.8 kb の DNA 断片が増幅されるが(図 4.2B 及び C), pBR322 全長(4.4 kb)が前述 HindIII 認識部位に挿入されている組換えプラスミドを鋳型とした場合, 5.2 kb の DNA 断片が増幅される(図 4.4). KGMA0119 株, 図 4.5 で示した候補株から抽出したプラスミド, 及び大腸菌から抽出した pBE2, pBE3, 及び pBR322 を鋳型として

PCR を行った結果, KGMA0119 株プラスミドからは 0.8 kb の DNA 断片が増幅されたのに対し, pBE2, pBE3, 及び図 4.5 で示した候補株由来プラスミドからは 5.2 kb の DNA 断片が増幅された(図 4.6, 中段). pBR322 からは, いかなる DNA 断片も増幅されなかった(図 4.6, 中段). 更に, pGE2 の ORF2-4 と相補な pGE2 probe, 及び pGE3 ORF3-3 及び ORF3-4 の遺伝子間領域と相補な pGE3 probe (図 4.2B 及び C)を用い, サザンブロット解析を行った. 大腸菌より抽出した pBE2 及び pBE3, 及び KGMA0119 株及び pBE2 を保持すると推測された候補株の全 DNA を SphI で消化した後, pGE2 probe を用いたハイブリダイゼーション反応を行ったところ, KGMA0119 株からは約 5 kb の DNA 断片が検出され, pBE2 及び候補株からは 7 kb 強の DNA 断片が検出された(図 4.6, 下段). 同様に pGE3 probe を用いたところ, KGMA0119 株からは 1.5 kb 強の DNA 断片が検出され, pBE3 及び pBE3 を保持すると推測された候補株からは約 4 kb の DNA 断片が検出された(図 4.6, 下段). これらの結果から, 2つの候補株細胞内における組換えプラスミドの存在が確認されたため, 両株をそれぞれ KGMA0119 (pBE2) 株及び KGMA0119 (pBE3)株とした. これらの結果から, 両組換えプラスミドが大腸菌及び *K. europaeus* 間におけるシャトルベクターとして利用出来る事が示された.

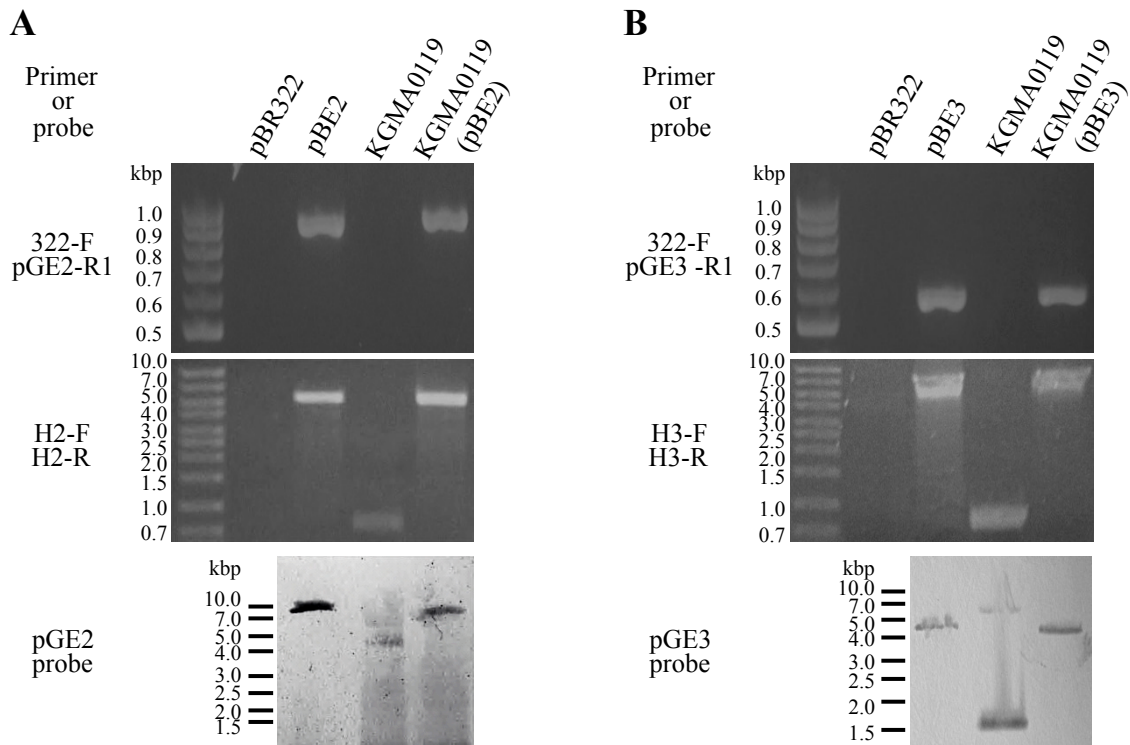


図4.6. 組換えプラスミドを保持する*K. europaeus*の遺伝子型同定. KGMA0119株(野生株), KGMA0119 (pBE2)株, 及びKGMA0119 (pBE3)株よりプラスミドDNA及び全DNAを抽出し, それぞれPCR解析(上段及び中段)及びサザンブロット解析(下段)に用いた. (A) KGMA0119 (pBE2)株の遺伝子型同定. (B) KGMA0119 (pBE3)株の遺伝子型同定. (上段) 図4.4に示したプライマー(322-F - pGE2-R1又は322-F - pGE3-R1)を用い, pGE2又はpGE3, 及びpBR322の連結部を標的としたPCRを行った. 各株より抽出したプラスミドDNAを鋳型として用いた. (中段) 図4.2及び4.4に示したプライマー(H2-F - H2-R又はH3-F - H3-R)を用い, 潜在型プラスミドのHindIII認識配列周辺, 及び組換えプラスミドにおける, HindIII認識部位に挿入されたpBR322を標的としたPCRを行った. 各株より抽出したプラスミドDNAを鋳型として用いた. (下段) 各株より抽出した全DNAをSphIで消化した後, 図4.2及び4.4に示したプローブ(pGE2 probe又はpGE3 probe)を用いてサザンブロット解析を行った. 対照として, 大腸菌より抽出・精製したpBR322, pBE2, 及びpBE3を用いた. プライマー及びプローブの位置, 及び各実験で増幅・検出されるDNA断片の長さを, 図4.2及び4.4に示した.

pBE2 及び pBE3 の宿主域を調べるため, 両組換えプラスミドを, エレクトロポレーション法により *A. pasteurianus* KGMA0054 株(野生株)へ導入した. pBE2 又は pBE3 の導入により得られたアンピシリン耐性コロニーを候補株とし, そのうちの一つを, そ

れぞれ KGMA0054 (pBE2)株の候補及び KGMA0054 (pBE3)株の候補とした(図 4.7A). この2候補株及びKGMA0054株から全DNAを抽出し, 潜在型プラスミド及びpBR322の連結部を標的としたPCRを行った(図 4.4). 対照実験として, 大腸菌より抽出したpBR322, pBE2, 及びpBE3を鋳型として用いたPCRを行った. その結果, pBE2及びpBE3, 及び図 4.7Aに示した候補株の全DNAからのみ標的領域がPCR増幅された(図 4.7B). pBR322及びKGMA0054株の全DNAからは, PCR増幅は起こらなかった(図 4.7B). これらの結果から, 両候補株を *A. pasteurianus* KGMA0054 (pBE2)株及びKGMA0054 (pBE3)株とし, pBE2及びpBE3が *A. pasteurianus* においても複製可能である事が示された.

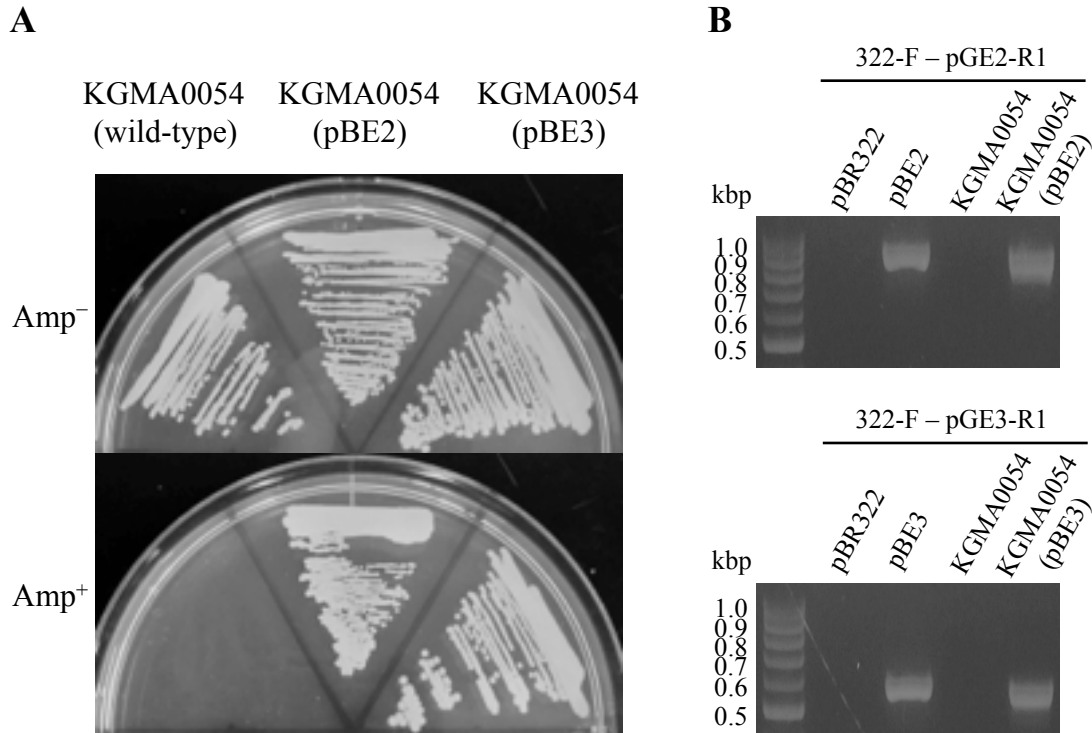


図4.7. 組換えプラスミドを保持する*A. pasteurianus*の抗生物質耐性と遺伝子型の同定. (A) 組換えプラスミドを保持する株のアンピシリン耐性. 2種の組換えプラスミドを*A. pasteurianus* KGMA0054株(野生株)へ導入する事で得られた, pBE2又はpBE3を細胞内に保持するKGMA0054 (pBE2)株又はKGMA0054 (pBE3)株を, 50 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンを含まない(上段), 或いは含む(下段)YPD寒天培地に画線した. 左, KGMA0054株; 中央, KGMA0054 (pBE2)株; 右, KGMA0054 (pBE3)株. (B) 組換えプラスミド保持株の遺伝子型同定. KGMA0054株, KGMA0054 (pBE2)株, 及びKGMA0054 (pBE3)株から抽出した全DNAを鋳型とし, 図4.4に示したプライマー(322-F - pGE2-R1又は322-F - pGE3-R1)を用いて, 組換えプラスミドにおける, 潜在型プラスミド及びpBR322の連結部を標的としたPCRを行った. プライマーの位置, 及びそれらにより増幅されるPCR産物の長さを図4.4に示した.

pGE1 を ClaI 又は SphI 消化により線状化し, pBR322 にクローニングする事で pGE1 由来の 2 種の組換えプラスミドを作製した. これらを *K. europaeus* KGMA0119 株へ導入したが, アンピシリン耐性コロニーは得られなかった. これは, 上記制限酵素による pGE1 の消化により, 娘細胞へのプラスミド伝達に必要な *mob* 遺伝子(図 4.2A 及び表 4.3)が破壊された事に起因すると考えられた.

第4節 考察

一般に、多くのプラスミドは宿主代謝への負荷を最小限に抑え、宿主と共存するために、自己のコピー数を低い状態に維持する(2, 4, 5). その一方で、本章研究において見られた潜在型プラスミドコピー数変動と類似の現象が、*Bacillus* 属細菌でも観察されている(9, 10). *Bacillus cereus* 及び *Bacillus thuringiensis* では生育段階に依存した PCN のゆらぎが見られ、対数期中期或いは対数期後期において PCN がその最大値に到達する(9, 10). これら *Bacillus* 属細菌における PCN 変動の生理学的意義として、プラスミドコピー数(遺伝子量)を増加させる事で、休眠状態にある(プラスミドを複製出来ない)芽胞へ十分量のプラスミドを伝達する(9)、或いはプラスミドにコードされる遺伝子の発現量を上昇させる(10)、と言った仮説がこれまでに提唱されている. しかしながら、PCN 変動に関する研究は極めて少なく、*Bacillus* 属細菌において見られる現象に関しても依然不明な点が多い. 本章における研究から、pGE1 及び pGE3 のコピー数は、培養液の初発酢酸濃度及び生育段階により影響を受ける事が示唆された(図 4.3). 特に、図 4.3C に示した結果から、高濃度(1.0%以上)の酢酸の存在が、対数期中期において両潜在型プラスミドのコピー数を上昇させる引き金として機能する可能性が示唆された. 序論において記述した様に、酢酸菌は、酢酸の毒性に抵抗するための種々の異化経路及び耐性機構を備えている(32-35). それら機構は、環境中に酢酸が存在する事で誘導される(32-35). これらの知見及び本章結果を踏まえると、pGE1 及び pGE3 にコードされる遺伝子は酢酸耐性及び異化に関与している可能性も示唆される. 更に、*B. thuringiensis* において提唱された仮説(10)に従うならば、*K. europaeus* KGMA0119 株は、プラスミドコピー数(遺伝子量)を上昇させる事で、酢酸代謝関連遺伝子の高発現を獲得している事も示唆される. その場合、酢酸を誘導物質とした、*K. europaeus* における遺伝子高発現システムの構築も期待される. PCN 変動の生理学的意義の解明には、潜在型プラスミドにコードされる遺伝子の発現動態を明らかにすると共に、それら遺伝子の破壊及びプラスミドのキュアリングが必須であろう.

本章研究において、*K. europaeus* KGMA0119 株より 3 種の潜在型プラスミドが単離・同定された(図 4.2). それらのシーケンス解析の結果、多数の制限酵素認識配列が同定された. 3 種のプラスミド全てにおいて EcoRI 認識配列が検出され、更に pGE1 は PstI 認識配列, pGE2 は KpnI 認識配列を保持していた. しかしながら、これら制限酵素では潜在型プラスミドを消化出来なかった(図 4.1, レーン 8-10). タイプ株 LMG 18890^T 株のドラフトゲノム解析から、*K. europaeus* は大腸菌等のモデル微生物と比較して、より多くの制限修飾系を有する事が予測されている(19). これを踏まえると、上記制限酵素認識部位は制限修飾系により保護(メチル化)されていると考えられる.

pGE2 の ORF2-3 は、プラスミドの安定的な維持・伝達に関与する Kid (RNase)をコードすると予測された. 大腸菌由来のプラスミド R100 等は、自己の宿主娘細胞への伝達を確実にするための機構(post-segregational killing system, PSK system)を備えている(30, 31). PSK system は、化学的に安定な毒性タンパク質(Kid)及び不安定な抗毒性タンパク質(killing-suppressor of Kid, Kis)から構成される機構であり、両タンパク質遺伝子はプラスミドにコードされている. プラスミドのコピー数が適切なレベルに維持されている場合は、プラスミドから Kis が十分量供給されるため、Kid の RNase 活性は抑制される. 一方、プラスミドを失った宿主細胞では、その化学的不安定性から Kis が不足し、結果として Kid が活性化される事で翻訳が阻害され、プラスミドを保持しない細胞は集団内から選択的に排除される(30, 31). 近年の詳細な研究から、Kid は基質特異性を有しており、細胞分裂に関与するタンパク質をコードする mRNA を選択的に分解する事が明らかにされた(図 4.8) (36). これにより、プラスミドが十分量複製されるまで細胞分裂が停止するため、当該プラスミドが宿主細胞集団内で安定的に維持される事となる(図 4.8) (36). これらの知見から、本章研究における pGE2 及び pGE2 由来組換えプラスミドは、*K. europaeus* 細胞内において安定的に維持される事が予想され、*in trans* 発現や遺伝子相補実験に適したプラスミドであると考えられる.

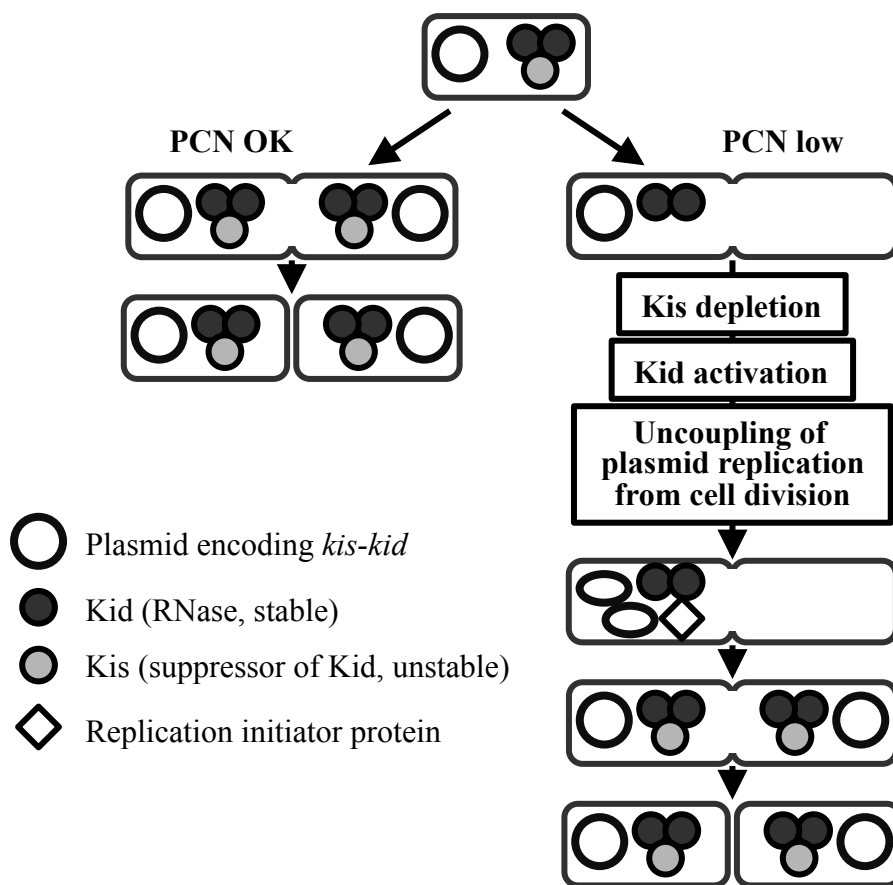


図4.8. Kis-Kidによる細胞集団内におけるプラスミドの安定的維持. 大腸菌由来プラスミドR100等にコードされるKid (RNase)及びKis (Kidに結合する事でRNase活性を抑制するサプレッサー)により, プラスミドは細胞集団内で安定的に維持される. Kid及びKisは化学的安定性が異なり, より安定なKidの活性を抑制するには, 不安定なKisを供給し続ける必要がある. 複製エラー等でプラスミドのコピー数が減少するとKisの供給量が減少し, その結果Kidが活性化する. Kidは細胞分裂に関与するタンパク質をコードするmRNAを特異的に分解する事で, プラスミドが十分量複製されるまで細胞分裂を停止させる. 複製が完了すると, 再びKisが供給されるため, KidのRNase活性は抑制され, 細胞分裂が再開する. Pimentel et al. (36)より抜粋した.

酢酸菌の潜在型プラスミドに着目すると, これまでは, 主に *Acetobacter* 属酢酸菌由来のプラスミドが研究対象とされてきた(12, 13). また, それらプラスミドを基とした, 大腸菌及び酢酸菌間におけるシャトルプラスミドもいくつか構築されている(14). 本章研究において構築された pBE2 及び pBE3 は, 大腸菌, *K. europaeus*, 及び *A. pasteurianus* 間におけるシャトルプラスミドとして機能した(図 4.5-4.7). *A.*

pasteurianus も食酢の工業生産に用いられている酢酸菌であり、上記 2 種の組換えプラスミドは、産業上重要なこれら酢酸菌の遺伝子改変における有効な手段となるであろう。また、KGMA0119 株より単離された 3 種のプラスミドは、それぞれ異なる複製起点を持ち、各々が和合性を示す。従って、pGE2 及び pGE3 由来の pBE2 及び pBE3 も互いに和合性であると考えられる。本章研究では、組換えプラスミド構築に当たり、 β -ラクタマーゼ遺伝子を選抜マーカー遺伝子として用いたが(図 4.4)、互いに異なる選抜マーカー遺伝子を潜在型プラスミドに導入する事で、複数の組換えプラスミドを保持する株の選抜も可能となるであろう。この事は、プラスミドを用いた酢酸菌の遺伝子改変を行う上で極めて有益であると考えられる。

第 2 章及び本章研究より、*K. europaeus* の代謝改変を図る上で必須となる基盤技術(遺伝子破壊法及びプラスミドを用いた遺伝子改変技術)の確立に成功した。

第 5 節 要約

酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* KGMA0119 株(野生株)より、3 種の潜在型プラスミド pGE1 (2,524 bp), pGE2 (7,187 bp), 及び pGE3 (5,537 bp)を単離した。相同性検索から、pGE1, pGE2, 及び pGE3 は、それぞれ 3, 8, 及び 4 つの遺伝子を保持する事が予測された。次に、リアルタイム定量 PCR により潜在型プラスミドの細胞内におけるコピー数(plasmid copy number, PCN)を測定した。KGMA0119 株を 0.4%エタノール及び 0.5%酢酸存在下で培養したところ、pGE1 の PCN は生育段階に依存した特徴的な変動パターンを示した。すなわち、対数期中期(7 コピー/ゲノム)から上昇し始め、定常期初期において最大値(12 コピー/ゲノム)に到達した。その後定常期後期において、最小値(4 コピー/ゲノム)まで減少した。pGE2 及び pGE3 は全ての生育段階を通して低いレベル(1-3 コピー/ゲノム)に維持されていた。高濃度(3.2%)エタノール存在下における培養では、3 種の潜在型プラスミドの PCN は、0.4%エタノール下で培養した時と同様

の挙動を示し、両培地組成間における顕著な差異は観察されなかった。一方、1.0%酢酸存在下で培養すると、pGE1 の PCN ピーク位置は、定常期初期から対数期中期へと遷移した(10 コピー/ゲノム)。更に、pGE3 の PCN も対数期中期において顕著に上昇した(6 コピー/ゲノム)。pGE2 の PCN は、全ての培地条件及び生育段階において、常に低レベル(1-3 コピー/ゲノム)に維持されていた。これらの結果から、pGE1 及び pGE3 は、生育段階及び酢酸濃度に応じて、自己のコピー数を変動させる事が示唆された。続いて、pGE2 及び pGE3 全長をクローニングベクターpBR322 へ連結する事で、2 種の組換えプラスミド pBE2 及び pBE3 を構築した。pBE2 及び pBE3 は大腸菌、*K. europaeus*、及び *Acetobacter pasteurianus* 細胞内で複製した事から、両組換えプラスミドは、大腸菌及び酢酸菌間におけるシャトルプラスミドとして利用しうる事が示された。本章研究により、*K. europaeus* 由来潜在型プラスミドを利用した遺伝子改変技術の基盤構築に成功した。

引用文献

1. **Akeno Y, Ying BW, Tsuru S, Yomo T.** 2014. A reduced genome decreases the host carrying capacity for foreign DNA. *Microb. Cell Fact.* **13**:49.
2. **del Solar G, Espinosa M.** 2000. Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol. Microbiol.* **37**:492-500.
3. **Seo JH, Bailey JE.** 1985. Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **27**:1668-1674.
4. **Costa M, Solà M, del Solar G, Eritja R, Hernández-Arriaga AM, Espinosa M, Gomis-Rüth FX, Coll M.** 2001. Plasmid transcriptional repressor CopG oligomerises to render helical superstructures unbound and in complexes with oligonucleotides. *J. Mol. Biol.* **310**:403-417.
5. **Lee C, Kim J, Shin SG, Hwang S.** 2006. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **123**:273-280.
6. **Chattoraj DK.** 2000. Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol. Microbiol.* **37**:467-476.
7. **Klumpp S, Zhang Z, Hwa T.** 2009. Growth rate-dependent global effects on gene expression in bacteria. *Cell* **139**:1366-1375.
8. **Klumpp S.** 2011. Growth-rate dependence reveals design principles of plasmid copy number control. *PLOS ONE* **6(5)**:e20403.
9. **Turgeon N, Laflamme C, Ho J, Duchaine C.** 2008. Evaluation of the plasmid copy number in *B. cereus* spores, during germination, bacterial growth and sporulation using real-time PCR. *Plasmid* **60**:118-124.
10. **Zhong C, Peng D, Ye W, Chai L, Qi J, Yu Z, Ruan L, Sun M.** 2011. Determination of plasmid copy number reveals the total plasmid DNA amount is greater than the

- chromosomal DNA amount in *Bacillus thuringiensis* YBT-1520. PLOS ONE **6(1)**:e16025.
11. **Srivastava P, Singh P, Narayanan N, Deb JK.** 2011. Physiological and biochemical consequences of host-plasmid interaction--a case study with *Corynebacterium renale*, a multiple cryptic plasmid containing strain. Plasmid **65**:110-117.
 12. **Okumura H, Uozumi T, Beppu T.** 1985. Construction of plasmid vectors and a genetic transformation system for *Acetobacter aceti*. Agric. Biol. Chem. **49**:1011-1017.
 13. **Fukaya M, Okumura H, Masai H, Uozumi T, Beppu T.** 1985. Construction of new shuttle vectors for *Acetobacter*. Agric. Biol. Chem. **49**:2083-2090.
 14. **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.
 15. **Azuma Y, Hosoyama A, Matsutani M, Furuya N, Horikawa H, Harada T, Hirakawa H, Kuhara S, Matsushita K, Fujita N, Shirai M.** 2009. Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. Nucleic Acids Res. **37**:5768-5783.
 16. **Kubiak K, Kurzawa M, Jędrzejczak-Krzepkowska M, Ludwicka K, Krawczyk M, Migdalski A, Kacprzak MM, Loska D, Krystynowicz A, Bielecki S.** 2014. Complete genome sequence of *Gluconacetobacter xylinus* E25 strain--valuable and effective producer of bacterial nanocellulose. J. Biotechnol. **176**:18-19.
 17. **Ogino H, Azuma Y, Hosoyama A, Nakazawa H, Matsutani M, Hasegawa A, Otsuyama K, Matsushita K, Fujita N, Shirai M.** 2011. Complete genome sequence of NBRC 3288, a unique cellulose-nonproducing strain of *Gluconacetobacter xylinus* isolated from vinegar. J. Bacteriol. **193**:6997-6998.
 18. **Prust C, Hoffmeister M, Liesegang H, Wiezer A, Fricke WF, Ehrenreich A,**

- Gottschalk G, Deppenmeier U.** 2005. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. Nat. Biotechnol. **23**:195-200.
19. **Andrés-Barrao C, Falquet L, Calderon-Copete SP, Descombes P, Ortega Pérez R, Barja F.** 2011. Genome sequences of the high-acetic acid-resistant bacteria *Gluconacetobacter europaeus* LMG 18890^T and *G. europaeus* LMG 18494 (reference strains), *G. europaeus* 5P3, and *Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2 (isolated from vinegar). J. Bacteriol. **193**:2670-2671.
20. **Akasaka N, Sakoda H, Hidese R, Ishii Y, Fujiwara S.** 2013. An efficient method using *Gluconacetobacter europaeus* to reduce an unfavorable flavor compound, acetoin, in rice vinegar production. Appl. Environ. Microbiol. **79**:7334-7342.
21. **Trček J, Raspor P, Teuber M.** 2000. Molecular identification of *Acetobacter* isolates from submerged vinegar production, sequence analysis of plasmid pJK2-1 and application in the development of a cloning vector. Appl. Microbiol. Biotechnol. **53**:289-295.
22. 赤坂直紀, 佐古田久雄, 藤原伸介. 2012. 酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* による分岐鎖アミノ酸の生産. 生物工学会誌 **90**:374-380.
23. **Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**:557-580.
24. **Bolívar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene **2**:95-113.
25. **Green MR, Sambrook JF.** 2012. Molecular Cloning: a laboratory manual, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
26. **Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL.** 2007. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. Bioinformatics **23**:673-679.

27. **Monzingo AF, Ozburn A, Xia S, Meyer RJ, Robertus JD.** 2007. The structure of the minimal relaxase domain of MobA at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **366**:165-178.
28. **Blankenfeldt W, Kuzin AP, Skarina T, Korniyenko Y, Tong L, Bayer P, Janning P, Thomashow LS, Mavrodi DV.** 2004. Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:16431-16436.
29. **Pierson LS 3rd, Pierson EA.** 2010. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**:1659-1670.
30. **Tsuchimoto S, Ohtsubo H, Ohtsubo E.** 1988. Two genes, *pemK* and *pemI*, responsible for stable maintenance of resistance plasmid R100. *J. Bacteriol.* **170**:1461-1466.
31. **Rheinberg A, Swierzy IJ, Nguyen TD, Horz HP, Conrads G.** 2013. Cryptic *Streptococcus* mutans 5.6-kb plasmids encode a toxin-antitoxin system for plasmid stabilization. *J. Oral Microbiol.* **5**:19729.
32. **Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S.** 2004. Enhanced expression of aconitase raises acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. *FEMS Microbiol. Lett.* **235**:315-322.
33. **Mullins EA, Francois JA, Kappock TJ.** 2008. A specialized citric acid cycle requiring succinyl-coenzyme A (CoA):acetate CoA-transferase (AarC) confers acetic acid resistance on the acidophile *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* **190**:4933-4940.
34. **Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S.** 2006. Putative ABC transporter responsible for acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:497-505.
35. **Matsushita K, Inoue T, Adachi O, Toyama H.** 2005. *Acetobacter aceti* possesses a proton motive force-dependent efflux system for acetic acid. *J. Bacteriol.* **187**:4346-4352.
36. **Pimentel B, Nair R, Bermejo-Rodríguez C, Preston MA, Agu CA, Wang X, Bernal JA, Sherratt DJ, de la Cueva-Méndez G.** 2014. Toxin Kid uncouples DNA replication

and cell division to enforce retention of plasmid R1 in *Escherichia coli* cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **111**:2734-2739.

第 5 章

分岐鎖アミノ酸生産能を付与する基盤技術の構築

第 1 節 緒言

食酢は酸味調味料であると同時に、近年多くの消費者から健康食品として認知されるようになった事を、第 2 章緒言において述べた。食酢主成分の酢酸は、AMP キナーゼ (5'-AMP-activated protein kinase, AMPK) の活性化を介して糖新生及び脂質合成を抑制する。このため、食酢の摂取により II 型糖尿病諸症状の緩和・低減が期待出来る(1)。この生理活性機能を根拠に、様々な食酢飲料が開発され、市場に流通するようになった(2)。第 2 章において、食酢の機能性を向上させるため、生活習慣病改善効果を有する分岐鎖アミノ酸(branched-chain amino acid, BCAA, バリン, ロイシン, 及びイソロイシン)に着目し、食酢生産酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* KGMA0119 株に BCAA 生産能を付与した株を作出した(3)。

分岐鎖アミノ酸、特にロイシンは、脂肪細胞及び骨格筋において脱共役タンパク質(uncoupling protein)の発現を促進し、エネルギーを熱として放散させる(4, 5)。これにより消費エネルギー量が増加し、高脂肪食に起因する体重増加(肥満)を抑制する事が出来る(4)。また、インスリン感受性を改善し、糖新生におけるグルコース-6-ホスファターゼの発現を抑制する事で、高血糖症を改善する(4, 6, 7)。従って、著量の BCAA を含む食酢を摂取する事で、より効果的な生活習慣病の予防・改善が期待出来る。

BCAA を含めたアミノ酸の生産法として、コリネ型細菌や大腸菌を用いた微生物発酵法が第一に挙げられる(8, 9)。アミノ酸生産菌を作出する有効な手法として、標的アミノ酸生合成経路におけるフィードバック制御機構の破壊が古くから採用されている(8)。バクテリアの BCAA 生合成経路に着目すると、バリン及びロイシンはピルビン酸を、イソロイシンはスレオニンを初発基質とした代謝経路により合成される(図 5.1)。第 2 章における研究から、*K. europaeus* も他の微生物同様の BCAA 生合成経路を

有する事が示された(図 5.1). 一般に, 3 種の BCAA 生合成における共通の律速酵素は, アセトヒドロキシ酸シンターゼ(acetohydroxyacid synthase, AHAS)である(図 5.1). 大腸菌は I-III 型の 3 種の AHAS アイソザイムを保持するが(8), 相同性検索の結果, *K. europaeus* の AHAS は大腸菌 III 型アイソザイム (*ilvIH* がコード: *ilvI*, 触媒サブユニット; *ilvH*, 調節サブユニット)と比較的高い相同性を示した(3). 大腸菌 III 型 AHAS は, バリン及びロイシンにより, それぞれフィードバック阻害(酵素活性阻害)及びフィードバック抑制(転写抑制)を受ける(8, 10). 特にロイシンによるフィードバック抑制は, アミノ酸代謝及び輸送に關与する遺伝子群の発現を包括的に制御する転写因子 leucine responsive regulatory protein (Lrp)を介して行われる(11, 12).

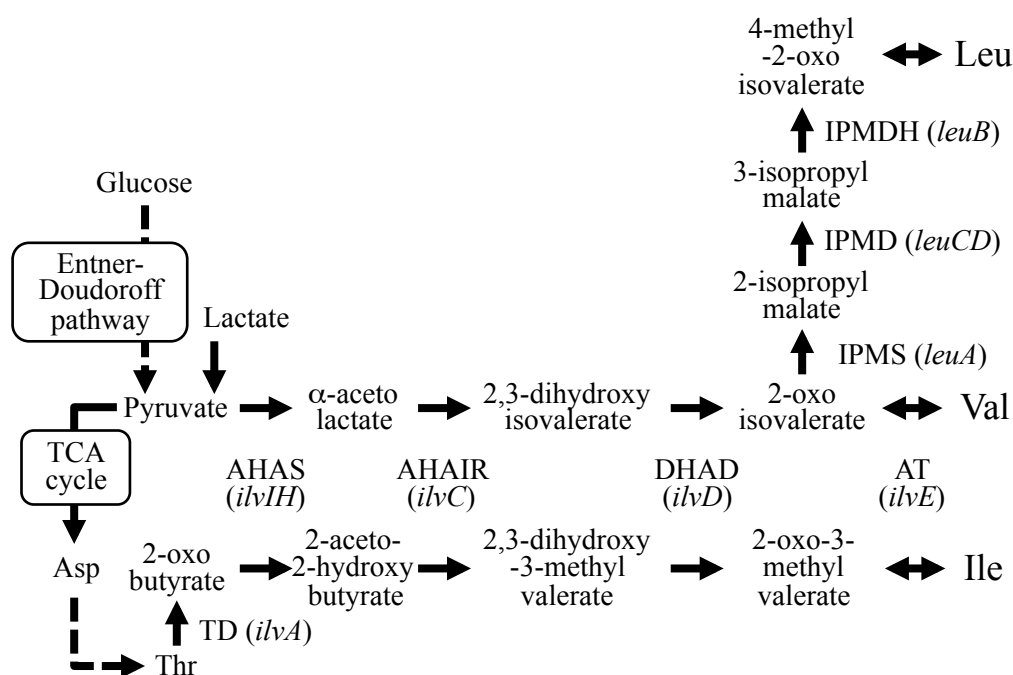


図5.1. *K. europaeus*のBCAA生合成経路. タイプ株LMG 18890^T株のドラフトゲノム配列から, *K. europaeus*におけるBCAA生合成経路を予測した(第2章参照). TD, threonine deaminase; AHAS, acetohydroxyacid synthase; AHAIR, acetohydroxyacid isomeroeductase; DHAD, dihydroxyacid dehydratase; AT, aminotransferase; IPMS, 2-isopropylmalate synthase; IPMD, 3-isopropylmalate dehydratase; IPMDH, 3-isopropylmalate dehydrogenase.

Lrp は AsnC 転写因子ファミリー(13, 14)に属している。AsnC は、アスパラギン合成に関与するアスパラギンシンテターゼ遺伝子(*asnA*)の転写を促進するが、十分量のアスパラギンが合成されると、合成されたアスパラギンがシグナル分子として機能し、AsnC の転写促進作用を抑制する(13)。AsnC は N 末端側に位置する DNA 結合領域(helix-turn-helix, HTH)、及び C 末端側に位置するシグナル分子(アスパラギン)結合部位から成る(14)。更に C 末端領域は、四次構造形成にも関与している(14)。Lrp も AsnC と同様の構造を有しているが(図 5.2B)、AsnC の標的遺伝子が *asnA* のみであるのに対し(14)、Lrp の標的は上記の通り広範囲にわたり、巨大なレギュロンを形成している(11, 15-18)。Lrp のオルソログはバクテリア及びアーキアを通じて広く保存されている(14, 17)。大腸菌では、全遺伝子のうちの約 10%の転写が Lrp により制御されており、標的の多くはアミノ酸代謝及び輸送に関与する遺伝子である(11)。Lrp は標的遺伝子に依存して、アクティベーターとしてもリプレッサーとしても機能するが、外界の栄養状況を伝達するシグナル(リガンド)分子ロイシンが Lrp C 末端領域に結合する事で、その転写促進又は抑制作用は調節を受ける(11)。*ilvIH* の転写は通常 Lrp により促進されるが、ロイシンが Lrp に結合する事によりその転写促進作用は相殺される(12)。一方、先行研究において、種々の変異型 Lrp 発現株が構築されており、それらを用いた解析から、ロイシンに応答しない変異型 Lrp を発現する大腸菌では、*ilvIH* の転写が恒常的となる事が明らかにされた(19)。この事から、BCAA 生産菌を構築する上で、ロイシン非感受性となる様な変異を Lrp に導入する事も、フィードバック阻害機構の破壊と同様、有効な戦略であると考えられる。

第2章において、*K. europaeus* にランダム変異を導入し、分岐鎖アミノ酸アナログ(α -アミノ酪酸 [α -aminobutyric acid, ABA])に対する耐性を付与する事で、バリン及びロイシンを生産する変異株 ABAr1-56 株を作出した(3)。本章では、ABAr1-56 株の変異点解析を行い、*K. europaeus* における Lrp オルソログ(*KeLrp*)の、132 番コドン(Trp)において検出されたナンセンス変異(G396A)が、同酢酸菌に BCAA 生産能を付与する決定因

子であると推測した。これを検証するため、第 3 章において確立した遺伝子破壊技術を用い、*Kelrp* 破壊株を構築し、それらの BCAA 生産能を解析した。

第 2 節 実験材料及び方法

供試菌株及び培地

本章において供試した菌株及びプラスミドを表 5.1 に記載した。*K. europaeus* の培養には、yeast-peptone-dextrose (YPD)培地(3)又は最少培地(窒素源として 1.0% [wt/vol] L-(+)-グルタミン酸ナトリウム・一水和物を含む) (3)を用いた。培養は全て 30°C で行い、液体培養の際は往復振盪 150 rpm で行った。特に明記しない限り、両培地に 0.4% (wt/vol)エタノール及び 0.5% (wt/vol)酢酸を加えて培養を行った。固形培地での培養の際は、YPD 培地及び最少培地に 9 g/l の寒天を加えたものを用いた。*Kelrp* 破壊株の生育特性解析には最少培地を用い、必要に応じて 0.5 mM BCAA (0.5 mM バリン, ロイシン, 及びイソロイシン), 又は 20 種のアミノ酸(0.5 mM アラニン, グリシン, バリン, ロイシン, イソロイシン, スレオニン, セリン, プロリン, アスパラギン, アスパラギン酸, メチオニン, フェニルアラニン, システイン, グルタミン, リジン, ヒスチジン, トリプトファン, アルギニン, 及びチロシン)を添加した。遺伝子破壊ベクターの構築には大腸菌 DH5 α 株(タカラバイオ, 滋賀) (20)を用いた。DH5 α 株の培養には 50 μ g/ml アンピシリン(シグマ・アルドリッチ社, アメリカ合衆国)を添加した Lysogeny broth (LB 培地) (21)を用い、37°C で培養した。

DNA 操作及びシーケンス解析

一般的な DNA 操作に関する手法は既報(21)に準拠した。PCR の際の DNA ポリメラーゼとして、KOD plus (東洋紡, 大阪)を用いた。PCR プライマーは、タイプ株 LMG 18890^T 株のドラフトゲノム配列(22)を基に設計した。制限酵素及び各種修飾酵素は、

タカラバイオ又はニッポン・ジーン(東京)より購入した。アガロースゲル電気泳動後の標的 DNA の精製には, NucleoSpin Gel and PCR Cleanup Kit (タカラバイオ)を用いた。遺伝子破壊ベクター構築には, クローニングベクターとして pBR322 (23)を用いた(タカラバイオ)。プラスミド DNA の抽出は, アルカリ抽出法(21)又は Plasmid Midi Kit (キアゲン社, ドイツ)を用いて行った。DNA シーケンス解析は, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 及び Model 3130 Capillary Sequencer (共にアプライド・バイオシステムズ社, アメリカ合衆国)を用いて行った。

表5.1. 供試菌株及びプラスミド

株・プラスミド	特徴	出典
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	20
<i>K. europaeus</i>		
KGMA0119株	食酢発酵液より単離(野生株)	3
KGMA0704株	KGMA0119株由来 <i>pyrE</i> 欠失株(Δ <i>pyrE</i>)	24
KGMA7110株	KGMA0704株由来 <i>Kelrp</i> 欠失株(Δ <i>pyrE</i> Δ <i>Kelrp::pyrE</i>)	本研究
KGMA7203株	KGMA0704株由来 <i>KeLrp</i> C末端領域欠損株(Δ <i>pyrE Kelrp</i> Δ (397-511):: <i>pyrE</i>)	本研究
プラスミド		
pBR322	Amp ^r	23
pBR322- Δ <i>Kelrp::pyrE</i>	pBR322由来 <i>Kelrp</i> 破壊ベクター(全長欠損, 図5.3参照)	本研究
pBR322- Δ <i>Kelrp2</i>	pBR322由来 <i>Kelrp</i> 破壊ベクター(C末端領域欠損, 図5.3参照)	本研究

***Kelrp* 破壊ベクター及び *Kelrp* 破壊株の構築**

Kelrp 破壊ベクター構築に用いた PCR プライマーを、**図 5.2** 及び**表 5.2** に記載した。遺伝子破壊は、破壊ベクターとの相同組換え(double crossover homologous recombination)により行った。*K. europaeus* KGMA0704 株($\Delta pyrE$)及びオロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(*pyrE*)を、それぞれ遺伝子破壊実験における宿主及び選抜マーカー遺伝子として用いた(24)。また、*Kelrp* 及び *pyrE* 遺伝子を含む領域の増幅には、鋳型として KGMA0119 株(野生株)の全 DNA を用いた。DNA 断片の連結は、DNA リガーゼ(Ligation-Convenience Kit, ニッポン・ジーン)を用いて行った。必要に応じ、プライマーの 5'末端を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ(タカラバイオ)を用いてリン酸化した。5'末端をリン酸化したプライマー EP-F2 及び E-R4 を用いて、*pyrE* 翻訳領域(open reading frame, ORF)及びそのプロモーターを含む 1.5 kb の領域(*pyrE* マーカー)を PCR 増幅した(**図 5.3**)。次に、*Kelrp* 全長を完全に欠失させる破壊ベクターを、以下の手順に従い作製した。*Kelrp* ORF 及びその 5'側上流及び 3'側下流領域(共に 1.0 kb)を含む 2.6 kb の領域を、*Kelrp*-F1 及び *Kelrp*-R1 を用いて PCR 増幅した(**図 5.2A**)。得られた PCR 産物及び pBR322 を BamHI 及び HindIII で消化し、両者を連結した。得られた中間プラスミドを鋳型とし、*Kelrp*-i1 及び *Kelrp*-i2 を用いたインバース PCR により、*Kelrp* ORF の 575 bp を除去した(**図 5.2A**)。得られた PCR 産物及び 5'末端をリン酸化した *pyrE* マーカーを連結し、pBR322- $\Delta Kelrp::pyrE$ とした(**図 5.3A**)。続いて、ABAr1-56 株 *Kelrp* 遺伝子座において検出された点変異(G396A)を導入するためのベクターを、以下の手順に従い作製した。*Kelrp* ORF の 396 番目に位置するグアニン残基を基点とし、その 5'側上流及び 3'側下流領域(共に 1.0 kb)を含む 2.0 kb の領域を、*Kelrp2*-F1 及び *Kelrp2*-R1 を用いて PCR 増幅した(**図 5.2A**)。得られた PCR 産物及び pBR322 を HindIII 及び BamHI で消化し、両者を連結した。得られた中間プラスミドを鋳型とし、*Kelrp2*-i1、及び 5'末端に G396A に対応する一塩基置換を有する *Kelrp2*-i2 を用いてインバース PCR を行う事で、ABAr1-56 株と同じ点変異を導入した(**図 5.2A**)。この時に、*Kelrp* ORF 397

番塩基以降の 115 bp (397–511 番塩基)を同時に除去した(図 5.2A). 得られた PCR 産物及び 5'末端をリン酸化した *pyrE* マーカーを連結し, pBR322- Δ *Kelrp2* とした(図 5.3B).

pBR322- Δ *Kelrp::pyrE* 及び pBR322- Δ *Kelrp2* を, 既報(第 3 章参照) (24)に従い KGMA0704 株に導入し, ウラシル原栄養性株を選抜した. 候補株の遺伝子型は, プライマーペア *Kelrp*-F1 – *Kelrp*-R1 又は *Kelrp2*-F1 – *Kelrp2*-R1 を用いた PCR(図 5.3), 及び得られた PCR 産物のシーケンス解析により同定した. *Kelrp* 完全欠失株, 及び G396A 点変異導入株を, それぞれ KGMA7110 株(Δ *pyrE* Δ *Kelrp::pyrE*)及び KGMA7203 株(Δ *pyrE* *Kelrp* Δ (397-511)::*pyrE*)とし(図 5.3), 以降の実験に供試した.

表5.2. プライマー

プライマー	配列 (5' - 3') ^{a, b}	目的
EP-F2	CTGCCATATCCCGTGTTTCGT	<i>pyrE</i> マーカー
E-R4	TCGCCATAGGGAAAGACTGC	<i>pyrE</i> マーカー
Kelrp-F1	AAGGATCCTACGGAGGCAGGTCAAGGACTCTT	<i>Kelrp</i> 全長欠損・遺伝子型同定
Kelrp-R1	AAA <u>AAGCTT</u> GCGAACAGCGCC	<i>Kelrp</i> 全長欠損・遺伝子型同定
Kelrp-i1	GTGACGGTGCGGTACAGCCC	<i>Kelrp</i> 全長欠損
Kelrp-i2	AGGAAATTGTGACGATAGGGTTTTTCTG	<i>Kelrp</i> 全長欠損
Kelrp2-F1	AAA <u>AAGCTT</u> AGCGCTTCTCCACCGCCGTATTG	<i>KeLrp</i> C末端領域欠損 遺伝子型同定
Kelrp2-R1	AAGGATCCCATGGCATGCTGCATGAATACGCAG	<i>KeLrp</i> C末端領域欠損 遺伝子型同定
Kelrp2-i1	ATGTGGTGCGCGTGCAGACG	<i>KeLrp</i> C末端領域欠損
Kelrp2-i2	TCAGCCCAGATACCTGGTTTTTCA	<i>KeLrp</i> C末端領域欠損
ilvI-qRT-Fw	TCGATCCCAGCCAGATCAAC	定量RT-PCR
ilvI-qRT-Rv	AGTCCCATTCTCCAGCATC	定量RT-PCR
ilvH-qRT-Fw	AATGGCGCTGGTCAAGGTG	定量RT-PCR
ilvH-qRT-Rv	CGCACCCGTCAGTTCAAAG	定量RT-PCR
ilvC-qRT-Fw	GGCACCTTTGTGCGCAACT	定量RT-PCR
ilvC-qRT-Rv	GCTTTTCGCCCCACCTTCTC	定量RT-PCR
ilvD-qRT-Fw	GATGCGGTGGAATACATGGTC	定量RT-PCR
ilvD-qRT-Rv	GAGACGAAGATGGTCGGAATG	定量RT-PCR
ilvE-qRT-Fw	TCTCGCCGACATTGCTG	定量RT-PCR
ilvE-qRT-Rv	CGCGACATGATGGATGG	定量RT-PCR
leuE-qRT-Fw	ATTCGCGATGGTGGAAGTG	定量RT-PCR
leuE-qRT-Rv	CCGAACCCGATAAACACGA	定量RT-PCR
16S-qRT-Fw	AACCTGGCTCATGACTGACG	定量RT-PCR
16S-qRT-Rv	CCCAACATCCAGCACACATC	定量RT-PCR

^a 制限酵素認識配列を下線で示した。

^b プライマーKelrp2-i2の5'末端は, ABAr1-56株で検出された点変異(G396A)を導入するための一塩基置換(C→T)を有する。

***Kelrp* 破壊株の BCAA 生産能解析**

KGMA0119株, KGMA7110株, 及びKGMA7203株を30 mlの最少培地で培養し, 培養液上清(培養液の遠心分離[4°C, 10,000 × g, 5分]により調製)を経時的に採取した。上清中に蓄積したBCAAを薄層クロマトグラフィー(thin layer chromatography, TLC) (25)

及びガスクロマトグラフィー(gas chromatography, GC)により定性・定量した。TLC 解析の際は、培養液上清及びBCAA標準溶液(1 mM バリン及びロイシン)を10 µl展開した。GC分析には、キャピラリーカラム(Zebron Amino Acid GC Column, 10 m × 0.25 mm, フェノメネックス社, アメリカ合衆国)を備え付けた GC-2010 (島津製作所, 京都)を用いた。キャリアガスとしてヘリウムを用い、流速 50 cm/分で分析を行った。カラム・オーブンの温度は、昇温速度 20°C/分で 80°C から 320°C まで上昇させた。培養液上清中のアミノ酸は、EZ:Faast Amino Acid Analysis Kit (フェノメネックス社) (26)を用いて誘導体化し、GC分析に供試した。内部標準として、20 nmol のノルバリンを分析サンプルに添加した。

転写量解析(quantitative reverse-transcription PCR, qRT-PCR [定量 RT-PCR])

KGMA0119 株, KGMA7110 株, 及び KGMA7203 株を 30 ml の最少培地で培養し, KGMA0119 株及び KGMA7203 株が対数期中期(培養 16 時間, 図 5.5)に到達した時点で上記 3 株の菌体を遠心分離(4°C, 10,000 × g, 5 分)により回収し, RNeasy Mini Kit (キアゲン社)を用いて菌体から全 RNA を抽出した。RNA サンプル中に混入した DNA は, DNaseI (ロシユ社, アメリカ合衆国)により分解した。BCAA 生合成及び排出に関与する遺伝子の転写量は, SuperScript III RT/Platinum Kit (インビトロジェン社, アメリカ合衆国)及び ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (アプライド・バイオシステムズ社)を用いた定量 RT-PCR により測定した。定量 RT-PCR に用いたプライマーを表 5.2 に記載した。検量線作成のため, 各遺伝子の標的領域を, KGMA0119 株全 DNA を鋳型とした PCR により増幅した(*ilvI*, *ilvI*-qRT-Fw – *ilvI*-qRT-Rv; *ilvH*, *ilvH*-qRT-Fw – *ilvH*-qRT-Rv; *ilvC*, *ilvC*-qRT-Fw – *ilvC*-qRT-Rv; *ilvD*, *ilvD*-qRT-Fw – *ilvD*-qRT-Rv; *ilvE*, *ilvE*-qRT-Fw – *ilvE*-qRT-Rv; *leuE*, *leuE*-qRT-Fw – *leuE*-qRT-Rv; 16S rRNA 遺伝子, 16S-qRT-Fw – 16S-qRT-Rv)。得られた PCR 産物 100, 10, 1, 0.1, 及び 0.01 pg を用い, 各遺伝子に特異的な検量線を作成した。全 RNA を鋳型とした定量 RT-PCR を行い, 標的

遺伝子の転写量を定量した。得られた測定値を 16S rRNA 遺伝子の転写量で除する事で標準化した。更に、株間の比較を行うため、遺伝子破壊株の転写量を、野生株 KGMA0119 株の転写量を 1 とした時の相対値で示した。PCR 増幅が特異的に行われた事を確認するため、反応終了後に融解曲線分析を行った。手順はメーカーのプロトコールに準拠した。

塩基配列のアクセッション番号

Kelrp, *ilvI*, *ilvH*, *ilvC*, 及び *leuE* の塩基配列は、それぞれ AB899159, AB899160, AB899161, AB899162, 及び AB899163 のアクセッション番号の下、データベース DDBJ, EMBL, 及び GenBank に登録された。

第 3 節 結果

K. europaeus の *lrp* オルソログ及び ABAr1-56 株の変異点解析

初めに、大腸菌 Lrp (P0ACJ0) のアミノ酸配列をクエリとして、タイプ株 LMG 18890^T 株のドラフトゲノム配列に対して相同性検索(TBLASTN)を行った。その結果、大腸菌 Lrp と高い同一性(40%)及び相同性(56%)を示すタンパク質をコードする遺伝子が同定された。これを *K. europaeus* における *lrp* オルソログ(*Kelrp*)とした。シーケンス解析の結果、KGMA0119 株(野生株)も同オルソログを保持する事が判明した。*Kelrp* はグリコシルトランスフェラーゼ(glycosyltransferase, *gt*)遺伝子とクラスターを形成しており、その 3'末端の 4 bp は *gt* 遺伝子と重複していた(図 5.2A)。また、ORF 上流において、*Kelrp* とは逆向きに配置されたチオレドキシンレダクターゼ(thioredoxin reductase, *tr*)遺伝子が同定された(図 5.2A)。*Kelrp* は 579 bp (192 アミノ酸残基)からなり、タンパク質の保存領域として、N 末端側に DNA 結合領域(HTH)が検出された(図 5.2B)。また C 末端側においても、AsnC ファミリー転写因子に特徴的な構造($\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$: α , α へ

リックス; β , β シート)が保存されていた(図 5.2B).

続いて、ランダム変異の導入により得られたバリン及びロイシン生産株である、ABAr1-56 株(3)の変異点解析を行った。標的として、BCAA 生合成系遺伝子群(図 5.1)及び *Kelrp* を選択した。シーケンス解析の結果、図 5.1 に示した BCAA 生合成に関与する遺伝子からは、いかなる変異も検出されなかった。一方で、*Kelrp* ORF 中において点変異が検出され、396 番目のグアニンはアデニンへと置換されていた(G396A) (図 5.2, アスタリスク [*])。この一塩基置換により 132 番目のトリプトファンコドン(UGG)は終止コドン(UGA)となる。これらの結果、及び大腸菌等で既に明らかにされている知見(11, 12, 19)から、この G396A 変異が *K. europaeus* に BCAA 生産能を付与する決定因子であると推測し、以降の実験において、2 種の *Kelrp* 破壊株を構築し、それらの諸特性を解析した。

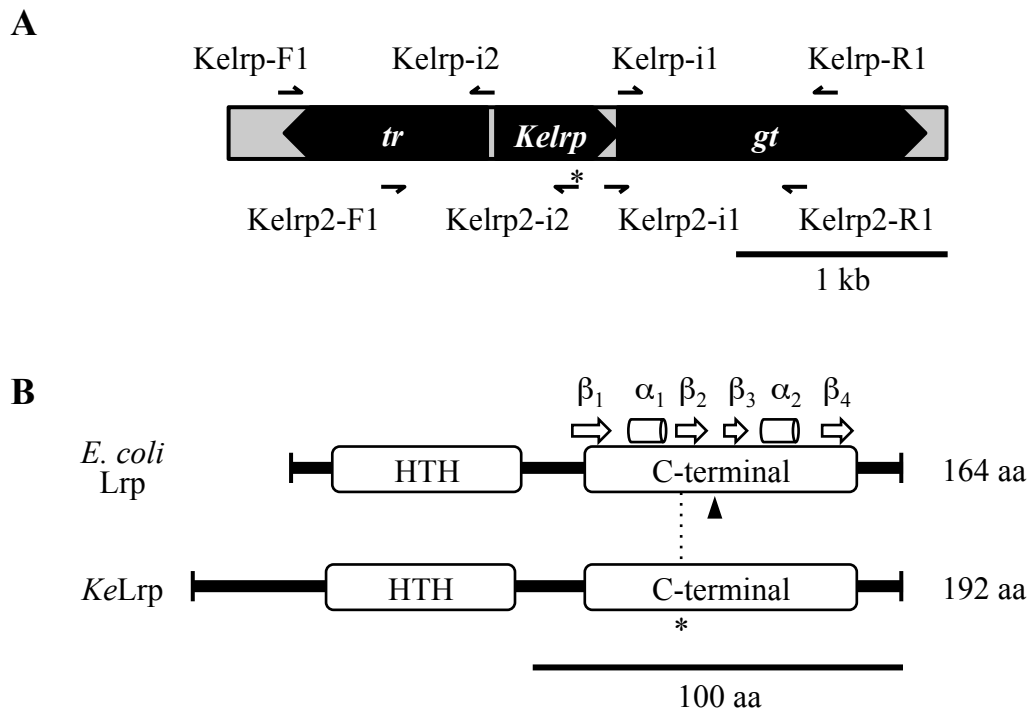


図5.2. ABAr1-56株*Kelrp*遺伝子において検出されたナンセンス変異. (A) *K. europaeus*の*Kelrp*遺伝子座. アスタリスク(*)はABAr1-56株*Kelrp*遺伝子内で検出された点変異(G396A)を示す. この変異により132番目のTrpコドンが終止コドンへ変化する. 模式図上部及び下部に示した矢印は, それぞれpBR322- Δ *Kelrp*::*pyrE*及びpBR322- Δ *Kelrp2*作製に用いたプライマーを示す(図5.3参照). *Kelrp2-i2*は, 5'末端にG396A点変異を導入するための一塩基置換(C→T)を有する. *tr*, thioredoxin reductase; *gt*, glycosyltransferase. (B) 大腸菌Lrpと*KeLrp*の構造比較. (上段) 大腸菌Lrp. 模式図上部の矢印(β_{1-4})及び円筒($\alpha_{1,2}$)は, それぞれ β シート及び α ヘリックス構造を示す. 模式図下部の黒三角は, リガンド(ロイシン)の推定結合部位を示す. (下段) *KeLrp*.アスタリスク(*)はABAr1-56株*Kelrp*遺伝子内で検出された点変異(G396A)を示す. HTH, helix-turn-helix; C-terminal, C-terminal ligand molecule binding domain; aa, amino acids.

***Kelrp* 破壊株の構築**

Kelrp 全長を欠損させるための破壊ベクター(pBR322- Δ *Kelrp*::*pyrE*), 及び G396A 点変異を導入するためのベクター(pBR322- Δ *Kelrp2*)を KGMA0704 株(Δ *pyrE*)に導入し, 2種の*Kelrp* 破壊株の構築を試みた(図 5.3). 得られた*Kelrp* 完全欠失株及び G396A 点変異導入株を, それぞれ KGMA7110 株(Δ *pyrE* Δ *Kelrp*::*pyrE*)及び KGMA7203 株(Δ *pyrE*

*Kelrp*Δ(397-511)::*pyrE*)とした(図 5.3). 両株の遺伝子型を確認するため, 図 5.3 に示したプライマーペア (*Kelrp*-F1 – *Kelrp*-R1 又は *Kelrp2*-F1 – *Kelrp2*-R1)を用いて KGMA0119 株, KGMA0704 株, KGMA7110 株, 及び KGMA7203 株の *Kelrp* 遺伝子座を PCR 増幅したところ, 遺伝子破壊株からは野生株及び親株よりも長い DNA 断片が増幅された(図 5.4). また, 得られた PCR 産物のシーケンス解析の結果, KGMA7110 株では *Kelrp* 全長が *pyrE* 遺伝子により置換され, KGMA7203 株では G396A の変異が導入されると共に *pyrE* 遺伝子が挿入されている事が確認された(図 5.3). これら結果より, *Kelrp* 遺伝子の欠失, 或いは点変異の導入が確認されたため, KGMA7110 株及び KGMA7203 株を以降の実験に供試した.

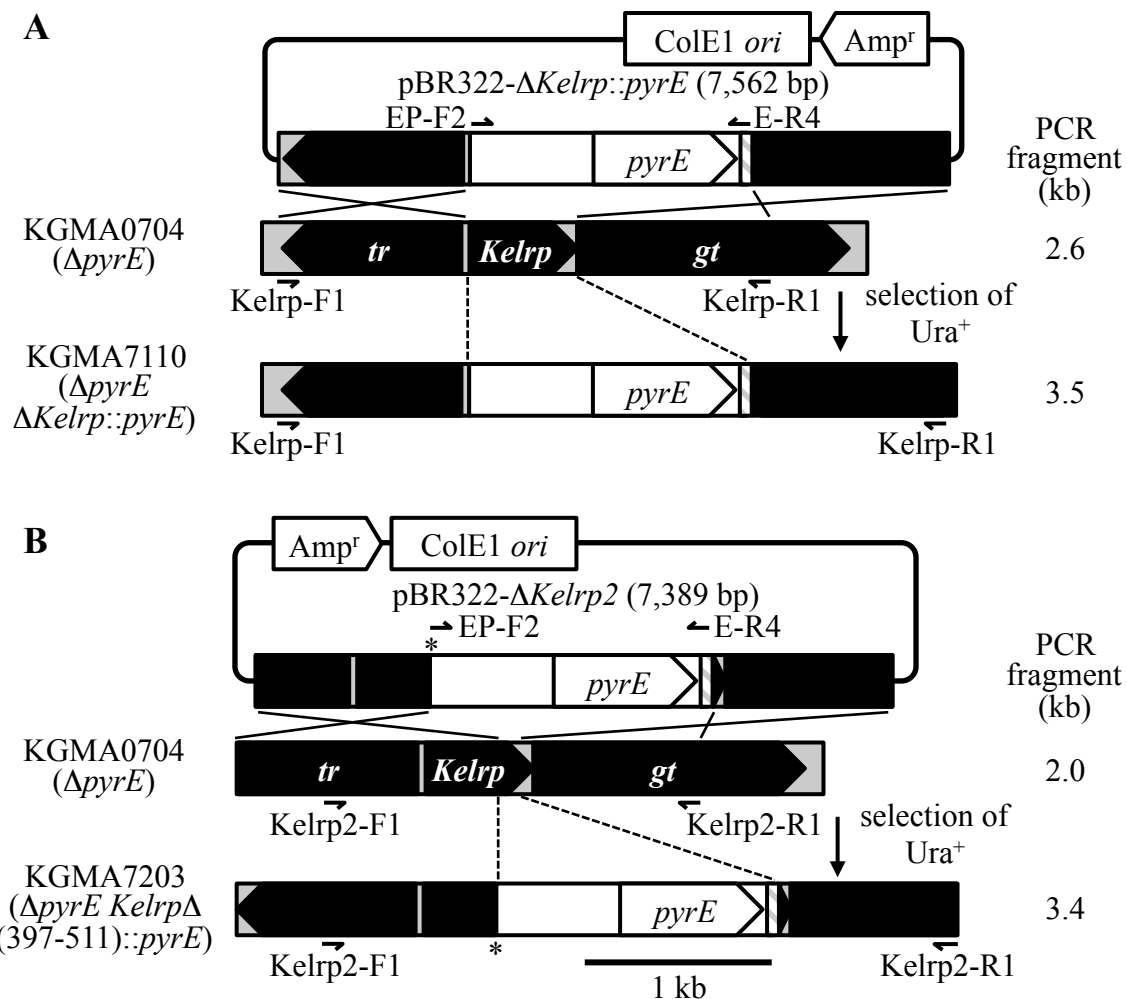


図5.3. *Kelrp*破壊株の構築. (A) *Kelrp*欠失株の構築. *Kelrp*全長を欠失させる破壊ベクター (pBR322- Δ *Kelrp*::*pyrE*)をKGMA0704株(Δ *pyrE*)に導入し, 得られた*Kelrp*欠失株をKGMA7110株(Δ *pyrE* Δ *Kelrp*::*pyrE*)とした. (B) C末端領域欠損変異型*KeLrp*発現株の構築. ABAr1-56株において検出された点変異(G396A)を有するpBR322- Δ *Kelrp2*をKGMA0704株に導入し, 得られた*Kelrp*部分欠損株をKGMA7203株(Δ *pyrE* *Kelrp* Δ (397-511)::*pyrE*)とした. G396A変異の導入により, KGMA7203株はC末端領域に位置する推定リガンド結合部位を欠損した変異型*KeLrp*を発現する. *pyrE*マーカー遺伝子は, EP-F2 - E-R4を用いたPCRにより作製した. 得られた2種の*Kelrp*破壊株の遺伝子型を, 模式図下部に示したプライマーを用いたPCRにより同定した(KGMA7110株, Kelrp-F1 - Kelrp-R1; KGMA7203株, Kelrp2-F1 - Kelrp2-R1. 図5.4参照). また, その際に増幅されるPCR産物の長さを模式図右に示した. 各遺伝子の詳細は図5.2に記載した.

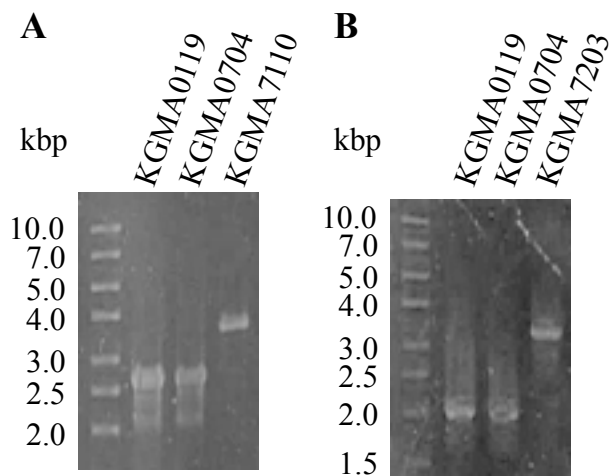


図5.4. *Kelrp*破壊株の遺伝子型同定. KGMA0119株(野生株), KGMA0704株 ($\Delta pyrE$), KGMA7110株 ($\Delta pyrE \Delta Kelrp::pyrE$), 及びKGMA7203株($\Delta pyrE Kelrp\Delta(397-511)::pyrE$)の染色体DNAを鋳型とし, 図5.3に示したプライマーを用いて各株の*Kelrp*遺伝子座をPCR増幅した. (A) KGMA7110株の遺伝子型同定. (B) KGMA7203株の遺伝子型同定. 用いたプライマーの位置, 及び増幅されるPCR産物の長さを図5.3に示した.

Kelrp 破壊株の生育特性解析

Lrp は大腸菌においてアミノ酸代謝及び輸送に関与する多数の遺伝子群の転写を制御している(11). また, *lrp* 遺伝子を完全に欠失させた大腸菌は, 著しい生育遅延を示す(16). *Kelrp* 遺伝子の破壊が生育に与える影響を検証するため, KGMA7110 株及びKGMA7203 株を最少培地で培養した. *Kelrp* 完全欠失株である KGMA7110 株は, 野生株と比較して著しい生育遅延を示した(図 5.5). この生育遅延は, 0.5 mM BCAA の添加により部分的に解消され, 20 種のアミノ酸(各 0.5 mM, 第 2 節参照)添加でほぼ完全に解消された(図 5.5). 一方で, KGMA7203 株は野生株とほぼ同等の生育を示し, KGMA7110 株で見られた様な生育遅延は観察されなかった(図 5.5).

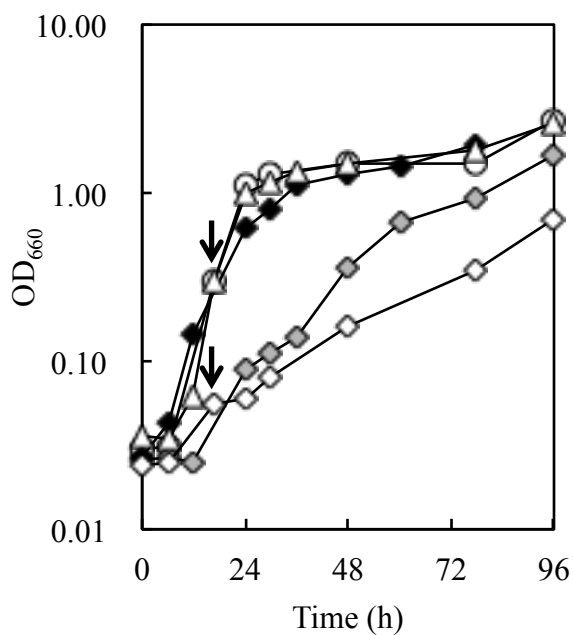


図5.5. *Kelrp*破壊株の生育特性解析. KGMA0119株(野生株), KGMA7110株 ($\Delta pyrE \Delta Kelrp::pyrE$), 及びKGMA7203株 ($\Delta pyrE Kelrp\Delta(397-511)::pyrE$)を最少培地で培養した($N=3$). 記号: 三角, KGMA0119株; ダイヤモンド, KGMA7110株; 丸, KGMA7203株. 色: 白, アミノ酸非添加; 灰色, 0.5 mM BCAA(バリン, ロイシン, 及びイソロイシン)添加; 黒, 20種の基本アミノ酸(各0.5 mM)添加. 値は3回の試行の平均値を示す. KGMA0119株及びKGMA7203株が対数期中期(16時間, 黒矢印)に到達した時点で, KGMA0119株, KGMA7110株, 及びKGMA7203株から全RNAを抽出し, 定量RT-PCRに供試した(図5.7参照).

Kelrp 破壊株の BCAA 生産能

図 5.5 で示した通り, 2 種の *Kelrp* 破壊株を最少培地で培養した. この時, 培養液上清中に蓄積した BCAA を, TLC 及び GC により定性・定量した. KGMA0119 株はいずれの BCAA も蓄積しなかったのに対し, KGMA7203 株は 96 時間の培養でバリン及びロイシンを, それぞれ 0.80 mM 及び 0.26 mM 蓄積した(図 5.6). また, KGMA7110 株も BCAA を生産し, 96 時間の培養でバリン及びロイシンを, それぞれ 0.48 mM 及び 0.11 mM 蓄積した(図 5.6). イソロイシンは, いずれの株の培養液上清からも検出されなかった(図 5.6C).

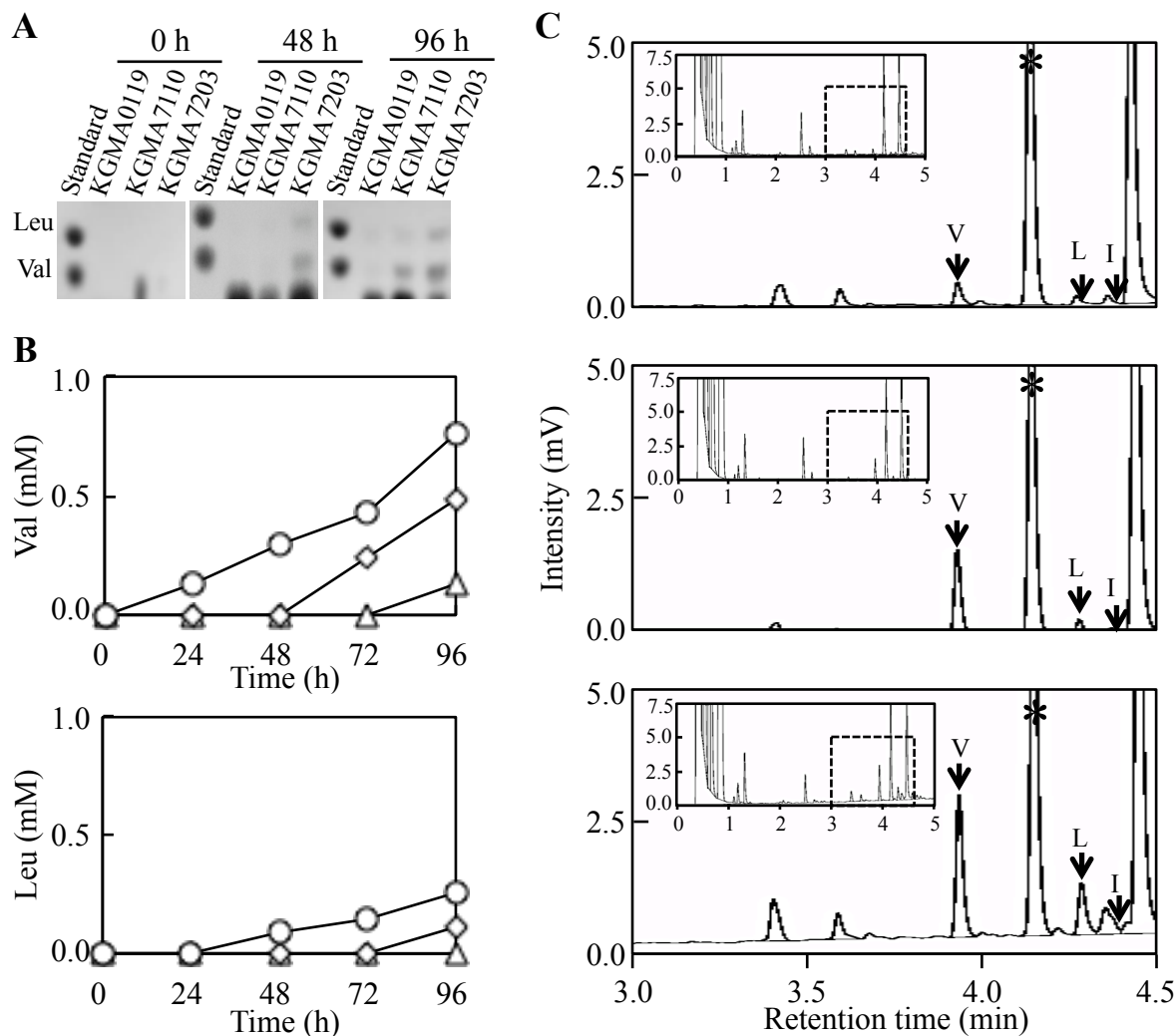


図5.6. *Kelrp*破壊株のBCAA生産能. KGMA0119株(野生株), KGMA7110株($\Delta pyrE \Delta Kelrp::pyrE$), 及びKGMA7203株($\Delta pyrE Kelrp\Delta(397-511)::pyrE$)を最少培地で培養し(図5.5参照), 培養液中に蓄積したBCAAをTLC及びGCにより定性・定量した. (A) TLC解析. 各株の培養液上清10 μ lをTLCにより展開した. 標準として, 10 μ lの1 mMバリン及びロイシンを展開した. (B) GC解析. 培養液上清中のBCAAをGCにより定量した($N=3$). 上段, バリン(mM); 下段, ロイシン(mM). 三角, KGMA0119株; ダイヤモンド, KGMA7110株; 丸, KGMA7203株. 値は3回の試行の平均値を示す. (C) 培養液上清中に蓄積したアミノ酸のガスクロマトグラム (培養96時間, 図5.5及び5.6B参照). 上段, KGMA0119株; 中段, KGMA7110株; 下段, KGMA7203株. 破線で示した領域(3.0–4.5分)を拡大表示した. V, バリン; L, ロイシン; I, イソロイシン; アスタリスク(*), 内部標準(20 nmolノルバリン).

BCAA 生合成及び排出に関与する遺伝子群の転写量解析

*Kelrp*破壊株のBCAA生産能と, 遺伝子発現動態との相関を解析するため, BCAA生

合成遺伝子 *ilvI*, *ilvH*, *ilvC* (アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ [acetohydroxyacid isomeroreductase, AHAI]), *ilvD* (ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ [dihydroxyacid dehydratase, DHAD]), 及び *ilvE* (アミノトランスフェラーゼ [aminotransferase, AT]) (図 5.1 及び 5.7A)の転写量を定量 RT-PCR により測定した. KGMA0119 株, KGMA7110 株, 及び KGMA7203 株を最少培地で培養し(図 5.5), KGMA0119 株及び KGMA7203 株の生育が対数期中期(16 時間, 図 5.5 矢印)に到達した時点で, 3 株から全 RNA を抽出し, それらを定量 RT-PCR の鋳型とした. 解析の結果, KGMA7203 株の *ilvI* 及び *ilvC* の転写量は, それぞれ野生株の 4 倍及び 6 倍に上昇していた(図 5.7B). KGMA7110 株においても BCAA 生合成遺伝子の転写量上昇が見られ, その上昇程度は KGMA7203 株とほぼ同等であった(図 5.7B). 遺伝子構造(図 5.7A)から *ilvI* と共転写されると推測される *ilvH* も, 両 *Kelrp* 破壊株においてその転写量は上昇していた(データ示さず). 一方, *ilvD* 及び *ilvE* の転写量に関しては, 3 株間で顕著な差異は観察されなかった(データ示さず). 微生物によるアミノ酸の高生産を達成するには, 生合成遺伝子群に加え, 排出ポンプ遺伝子の高発現も効果的である(27). そこで, 大腸菌においてロイシン及びバリンの排出を担う *LeuE* (AAC74868) (28, 29)に着目し, *LeuE* アミノ酸配列をクエリとして, タイプ株 LMG 18890^T 株のドラフトゲノム配列(22)に対して相同性検索(TBLASTN)を行った. その結果, 比較的高い同一性(26%)及び相同性(48%)を示すタンパク質をコードする推定遺伝子が, ゲノム中で 1 コピーのみ同定された(図 5.7A). これを *K. europaeus* における *leuE* オルソログとし, その転写量を解析した. KGMA7203 株の *leuE* 転写量は野生株とほぼ同等であったのに対し, KGMA7110 株の転写量は, 野生株の 5 倍にまで上昇していた(図 5.7B).

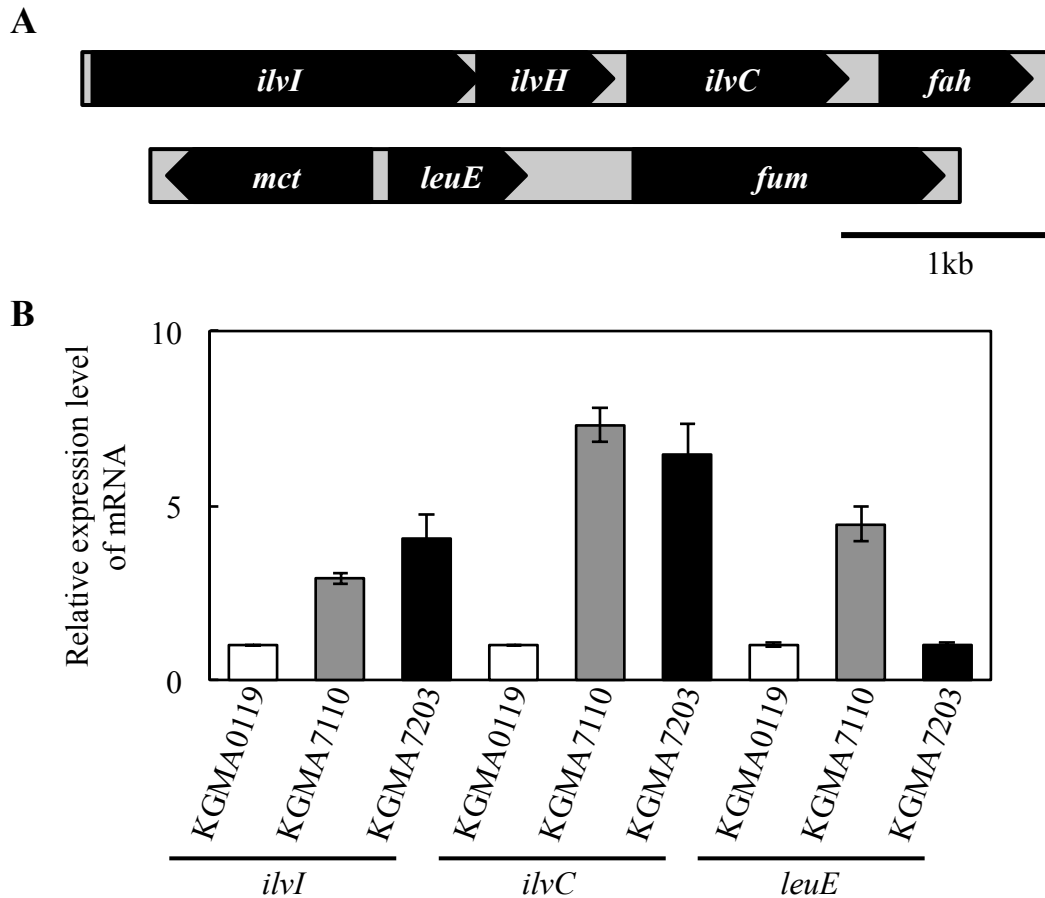


図5.7. BCAA生合成及び排出に関与する遺伝子群, 及びそれらの転写量解析. (A) BCAA生合成系遺伝子クラスター(*ilvIHC*, 上段)及びBCAA排出ポンプ遺伝子(*leuE*, 下段). *ilvI*, acetohydroxyacid synthase large subunit; *ilvH*, acetohydroxyacid synthase small subunit; *ilvC*, acetohydroxyacid isomeroreductase; *fah*, fumarylacetoacetate hydroxylase; *mct*, metallic cation transporter; *leuE*, exporter of BCAAs; *fum*, fumarase. (B) *ilvI*, *ilvC*, 及び*leuE*の転写量解析. KGMA0119株(野生株), KGMA7110株($\Delta pyrE \Delta Kelrp::pyrE$), 及びKGMA7203株($\Delta pyrE Kelrp\Delta(397-511)::pyrE$)における*ilvI*, *ilvC*, 及び*leuE*の転写量を, 定量RT-PCRにより測定した. *Kelrp*破壊株の転写量は, KGMA0119株転写量を1とした時の相対値で示した. 鋳型に用いた全RNAは, 最少培地において16時間培養した時に得られた菌体から抽出した(図5.5参照). 白, KGMA0119株; 灰色, KGMA7110株; 黒, KGMA7203株. エラーバーは標準偏差を表す($N=3$).

第4節 考察

本章における研究から, *K. europaeus* における Lrp オルソログ(*KeLrp*)が同定された. *KeLrp* は, 他の AsnC ファミリー(14)に属する転写因子と同様に, 典型的な2つの保存

領域(N末端側 DNA 結合領域及びC末端側推定リガンド結合領域)を保持していた(図 5.2B). 一般に, Lrp を含めた AsnC ファミリー転写因子は, C 末端領域に特徴的な $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ 構造を有する(図 5.2B) (17, 30). 大腸菌における変異型 Lrp を用いた詳細な解析から, リガンド分子であるロイシンの結合部位は, β_2 及び β_3 間のループ構造であると推測されている(30). これを踏まえると, ABAr1-56 株(3)及び KGMA7203 株が持つ, *Kelrp* における G396A 点変異は, α_1 及び β_2 間のループ構造内に位置するものと推測される(図 5.2B). この位置にナンセンス変異が導入される事により, 上記 2 株は C 末端側リガンド結合領域を欠損した変異型 *KeLrp* を発現しているものと考えられ, その様な変異型 *KeLrp* は, リガンド分子に対して非感受性であると推測される. 大腸菌の場合, 通常 Lrp は *ilvIH* の転写を促進し, ロイシンが C 末端側リガンド結合部位に結合する事で, その転写促進作用は抑制される(11, 12). また, ロイシン非感受性の変異型 Lrp を発現する大腸菌では, *ilvIH* の発現が恒常的となる事が知られている(19). 一方, *lrp* 遺伝子を完全に欠失させた変異株における *ilvIH* の転写量は, 野生株と比較して著しく低下する(12, 19). この様な大腸菌で観察された現象とは対照的に, 本研究において構築された *Kelrp* 完全欠失株(KGMA7110 株), 及び G396A 点変異導入株(KGMA7203 株, *KeLrp* C 末端領域の推定リガンド結合部位欠損株)共に, *ilvIH* を高発現していた(図 5.7B). この結果を踏まえると, *KeLrp* は, 大腸菌 Lrp と異なる制御様式を持つ事が示唆される. 特に, *ilvIH* に対してはリプレッサーとして機能すると考えられる(図 5.8A). 一方で, KGMA7110 株の生育遅延は, アミノ酸の添加により解消された(図 5.5). この事実は, 大腸菌 Lrp 同様, *KeLrp* もアミノ酸代謝に関わる遺伝子の発現全般を包括的に制御している事を強く支持する結果であると考えられる. *KeLrp* のリガンド分子特定を含めた詳細な機能解析が現在行われている.

定量 RT-PCR の結果から, KGMA7110 株及び KGMA7203 株は, どちらも *ilvIH* 及び *ilvC* 遺伝子を高発現している事が明らかとなった(図 5.7B). 両株共に培養液中に BCAA を蓄積したが, 生産量には差が見られ, 完全欠失株である KGMA7110 株は著し

い生育遅延を示した(図 5.5). 更にその生育遅延は, BCAA の添加により部分的に解消された(図 5.5). これらに加え, KGMA7110 株は, BCAA 排出ポンプ遺伝子と考えられる *leuE* を, 野生株及び KGMA7203 株の 5 倍量発現していた(図 5.7B). 大腸菌では, LeuE が適切なレベルで発現する限り, 細胞内に蓄積した過剰量のロイシン及びバリンのみが細胞外へ排出される(28, 29). この事実を踏まえると, LeuE を過剰発現している KGMA7110 株では, 自身の生育に必須な BCAA までも細胞外へ排出されてしまっている事が予想される. 従って, KGMA7110 株が示した生育遅延及び弱い BCAA 要求性(図 5.5)は, BCAA 生合成の停滞ではなく, LeuE 高発現によるロイシン及びバリンの異常排出に起因するものと推測される(図 5.8B).

KGMA7203 株は C 末端側の推定リガンド結合部位を欠損した変異型 *KeLrp* を発現し, リガンド分子に対して非感受性であると考えられる. KGMA7110 株及び KGMA7203 株間で *leuE* の転写量に差異が見られた事から(図 5.7B), この変異型 *KeLrp* は, 完全にはその機能を失ってはおらず, 標的遺伝子群の転写に対して, 依然いくらかの影響を及ぼすものと考えられる. 変異型 *KeLrp* の細胞内における挙動を明らかにするには更なる詳細な解析が必要ではあるものの, *leuE* の転写制御については, N 末端側の DNA 結合領域のみでも十分な機能を発揮出来るものと推測される(図 5.7B 及び 5.8A). その一方で, *ilvIH* の転写抑制には C 末端領域が必須である事がうかがえ, 同領域の欠損により, リプレッサーとしての機能は失われる(図 5.7B 及び 5.8A). これらを考慮すると, KGMA7203 株が野生株と同等の生育を維持しながらバリン及びロイシンを生産出来るのは, 同株が BCAA 生合成遺伝子を高発現すると共に LeuE を適切なレベルで発現する事で(図 5.7B), 自身の生育に必要なバリン及びロイシンは細胞内にとどめつつ, 不要な分のみを排出しているためと推測される(図 5.8B).

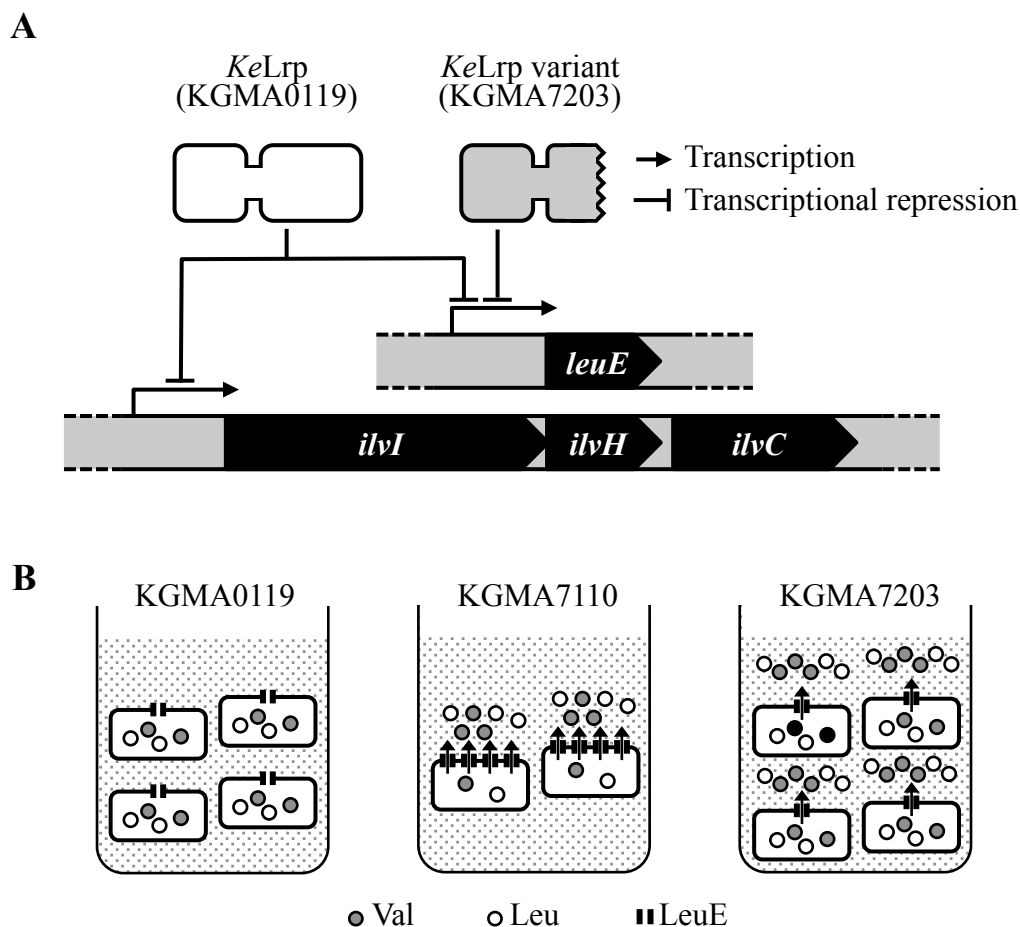


図5.8. *Kelrp*破壊株のBCAA生産機序モデル. (A) *KeLrp*及びC末端領域欠損変異型*KeLrp*の標的遺伝子発現制御モデル. 各遺伝子の詳細は図5.7に記載した. (B) *Kelrp*破壊株のBCAA生産及び排出モデル. 左, KGMA0119株(野生株); 中央, KGMA7110株($\Delta pyrE \Delta Kelrp::pyrE$); 右, KGMA7203株($\Delta pyrE Kelrp\Delta(397-511)::pyrE$). 灰色丸, バリン; 白丸, ロイシン; 黒二重線, LeuE (BCAA排出ポンプ).

本章の研究から, *Kelrp* 遺伝子の破壊が, *K. europaeus* に BCAA 生産能を付与する決定因子である事が解明された. 一方で, ABAr1-56 株及び本章において構築された2種の *Kelrp* 破壊株の BCAA 生合成遺伝子は野生型のままであり, フィードバック制御機構の多くは依然正常に機能している事が予測される. BCAA の生合成は, 多段階のフィードバック制御機構により制御されている(8). 例えば, ロイシン生合成の律速酵素は AHAS 及び 2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ(2-isopropylmalate synthase, IPMS)で

ある(図 5.1). *K. europaeus* が保持すると考えられる III 型 AHAS は, バリンが調節サブユニットに結合する事で(31, 32), また IPMS は C 末端の調節領域にロイシンが結合する事でその酵素活性が阻害される(33). これら酵素のリガンド結合部位は変異株を用いた解析から厳密に特定されており, その知見を基にアミノ酸置換を導入する事で, フィードバック阻害耐性を有する酵素のデザインも可能である(31-33). KGMA7203 株は, 野生株と同等の生育を示した(図 5.5). 微生物による物質生産を検討する上で, 菌体収量は生産性に直結する重要な要素の一つである. 従って, KGMA7203 株は, KGMA7110 株よりも好ましい BCAA 生産プラットフォームであると言える. この KGMA7203 株に上記の様な変異を導入する事で, BCAA 生産性の向上が期待出来るであろう.

第 5 節 要約

分岐鎖アミノ酸(branched-chain amino acid, BCAA, バリン, ロイシン, 及びイソロイシン), 特にロイシンは, 肥満や高血糖症等の生活習慣病諸症状を緩和・低減する生理活性機能を有する. また, 食酢の主成分である酢酸は, 脂質合成及び糖新生を抑制する作用を有しており, II 型糖尿病治療の一助になる事が期待されている. 従って, BCAA を含む食酢は, 生活習慣病の症状を改善する上でより効果的であると考えられる. 第 2 章の研究で得られた知見を基に, 食酢製造酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* の転写因子 leucine responsive regulatory protein (*KeLrp*)に着目し, *KeLrp* を破壊する事で BCAA 生産能の付与を試みた. KGMA0119 株(野生株)はいずれの BCAA も生産しなかったのに対し, *KeLrp* 遺伝子全長を欠失させた KGMA7110 株($\Delta pyrE \Delta KeLrp::pyrE$)は, 培養液中にバリン及びロイシンを, それぞれ 0.48 mM 及び 0.11 mM 蓄積した. しかしながら, KGMA7110 株は著しい生育遅延を示し, 正常な生育には 20 種の基本アミノ酸を要求した. 一方, 第 2 章において作出された BCAA 生産株 ABAr1-56 株の変異点解

析の結果、同株の *Kelrp* 遺伝子 132 番トリプトファンコドンの位置に、ナンセンス変異が導入されている事が明らかとなった。これを踏まえ、同様の変異を導入した KGMA7203 株($\Delta pyrE$ *Kelrp* Δ (397-511)::*pyrE*)を構築した。KGMA7203 株は推定シグナル(リガンド)分子結合部位を含む、C末端領域の欠損した変異型 *KeLrp* を発現すると考えられる。KGMA7203 株は野生株と同等の生育を示し、更に KGMA7110 株よりも多くのバリン(0.80 mM)及びロイシン(0.26 mM)を培養液中に蓄積した。定量 RT-PCR により BCAA 生合成遺伝子(*ilvI* 及び *ilvC*)の転写量を測定した結果、それら遺伝子の転写量は両 *Kelrp* 破壊株において、野生株よりも顕著に上昇していた。更に BCAA 排出ポンプ遺伝子(*leuE*)の転写量を測定したところ、KGMA7110 株においてのみ高発現が確認された。これらの結果から、KGMA7110 株は BCAA 生合成及び排出ポンプ遺伝子を同時に高発現する事でバリン及びロイシンを培養液に蓄積するが、自身の生育に必須な BCAA まで排出し、その結果生育遅延が引き起こされたものと推測された。対照的に、KGMA7203 株は生合成遺伝子を高発現すると同時に、適切な量の排出ポンプを発現しており、自身の生育に不要な BCAA のみ細胞外に排出する事で、正常な生育及び BCAA の高生産を達成しているものと考えられた。本章研究から、*K. europaeus* に BCAA 生産能を付与する決定因子が *KeLrp* の欠失、或いはその C 末端領域の欠損である事が解明された。生育遅延を示す事なく BCAA 生産を達成出来る KGMA7203 株は、BCAA 含有食酢の製造において望ましい菌株であると考えられる。

引用文献

1. **Sakakibara S, Yamauchi T, Oshima Y, Tsukamoto Y, Kadowaki T.** 2006. Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A (y) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**:597-604.
2. 佐古田久雄, 赤坂直紀, 藤原伸介. 2014. 酢酸菌の新たな利用法. *日本醸造協会誌* **109**:147-153.
3. 赤坂直紀, 佐古田久雄, 藤原伸介. 2012. 酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* による分岐鎖アミノ酸の生産. *生物工学会誌* **90**:374-380.
4. **Zhang Y, Guo K, LeBlanc RE, Loh D, Schwartz GJ, Yu YH.** 2007. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes* **56**:1647-1654.
5. **Arakawa M, Masaki T, Nishimura J, Seike M, Yoshimatsu H.** 2011. The effects of branched-chain amino acid granules on the accumulation of tissue triglycerides and uncoupling proteins in diet-induced obese mice. *Endocrinol. Jpn.* **58**:161-170.
6. **Guo K, Yu YH, Hou J, Zhang Y.** 2010. Chronic leucine supplementation improves glycemic control in etiologically distinct mouse models of obesity and diabetes mellitus. *Nutr. Metab (Lond).* **7**:57.
7. **Macotela Y, Emanuelli B, Bång AM, Espinoza DO, Boucher J, Beebe K, Gall W, Kahn CR.** 2011. Dietary leucine - an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. *PLOS ONE* **6(6)**:e21187.
8. 相田浩, 滝波弘一, 千畑一郎, 中山清, 山田秀明. 1986. アミノ酸発酵. 学会出版センター. 東京.
9. **Sano C.** 2009. History of glutamate production. *Am. J. Clin. Nutr.* **90**:728S-732S.
10. **Kisumi M, Komatsubara S, Chibata I.** 1971. Valine accumulation by α -aminobutyric acid-resistant mutants of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **106**:493-499.

11. **Cho BK, Barrett CL, Knight EM, Park YS, Palsson BØ.** 2008. Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **105**:19462-19467.
12. **Platko JV, Willins DA, Calvo JM.** 1990. The *ilvIH* operon of *Escherichia coli* is positively regulated. J. Bacteriol. **172**:4563-4570.
13. **Kölling R, Lothar H.** 1985. AsnC: an autogenously regulated activator of asparagine synthetase A transcription in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **164**:310-315.
14. **Yokoyama K, Ishijima SA, Clowney L, Koike H, Aramaki H, Tanaka C, Makino K, Suzuki M.** 2006. Feast/famine regulatory proteins (FFRPs): *Escherichia coli* Lrp, AsnC and related archaeal transcription factors. FEMS Microbiol. Rev. **30**:89-108.
15. **Brinkman AB, Ettema TJ, de Vos WM, van der Oost J.** 2003. The Lrp family of transcriptional regulators. Mol. Microbiol. **48**:287-294.
16. **Newman EB, Lin R.** 1995. Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. Annu. Rev. Microbiol. **49**:747-775.
17. **Thaw P, Sedelnikova SE, Muranova T, Wiese S, Ayora S, Alonso JC, Brinkman AB, Akerboom J, van der Oost J, Rafferty JB.** 2006. Structural insight into gene transcriptional regulation and effector binding by the Lrp/AsnC family. Nucleic Acids Res. **34**:1439-1449.
18. **Holmqvist E, Unoson C, Reimegård J, Wagner EG.** 2012. A mixed double negative feedback loop between the sRNA MicF and the global regulator Lrp. Mol. Microbiol. **84**:414-427.
19. **Platko JV, Calvo JM.** 1993. Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. J. Bacteriol. **175**:1110-1117.
20. **Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**:557-580.

21. **Green MR, Sambrook JF.** 2012. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
22. **Andrés-Barrao C, Falquet L, Calderon-Copete SP, Descombes P, Ortega Pérez R, Barja F.** 2011. Genome sequences of the high-acetic acid-resistant bacteria *Gluconacetobacter europaeus* LMG 18890^T and *G. europaeus* LMG 18494 (reference strains), *G. europaeus* 5P3, and *Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2 (isolated from vinegar). *J. Bacteriol.* **193**:2670-2671.
23. **Bolívar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.
24. **Akasaka N, Sakoda H, Hidese R, Ishii Y, Fujiwara S.** 2013. An efficient method using *Gluconacetobacter europaeus* to reduce an unfavorable flavor compound, acetoin, in rice vinegar production. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**:7334-7342.
25. 日本生物工学会編. 2002. *生物学実験書 改訂版*. 培風館. 東京.
26. **Badawy AA.** 2012. The EZ:Faast family of amino acid analysis kits: application of the GC-FID kit for rapid determination of plasma tryptophan and other amino acids. *Methods Mol. Biol.* **828**:153-164.
27. **Ikeda M, Mitsuhashi S, Tanaka K, Hayashi M.** 2009. Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* L-arginine and L-citrulline producer. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:1635-1641.
28. **Kutukova EA, Livshits VA, Altman IP, Ptitsyn LR, Ziyatdinov MH, Tokmakova IL, Zakataeva NP.** 2005. The *yeaS (leuE)* gene of *Escherichia coli* encodes an exporter of leucine, and the Lrp protein regulates its expression. *FEBS Lett.* **579**:4629-4634.
29. **Zakataeva NP, Aleshin VV, Tokmakova IL, Troshin PV, Livshits VA.** 1999. The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS*

Lett. **452**:228-232.

30. **Ettema TJ, Brinkman AB, Tani TH, Rafferty JB, Van Der Oost J.** 2002. A novel ligand-binding domain involved in regulation of amino acid metabolism in prokaryotes. *J. Mol. Chem.* **277**:37464-37468.
31. **Mendel S, Elkayam T, Sella C, Vinogradov V, Vyazmensky M, Chipman DM, Barak Z.** 2001. Acetohydroxyacid synthase: a proposed structure for regulatory subunits supported by evidence from mutagenesis. *J. Mol. Chem.* **307**:465-477.
32. **Park JH, Lee KH, Kim TY, Lee SY.** 2007. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and *in silico* gene knockout simulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:7797-7802.
33. **Koon N, Squire CJ, Baker EN.** 2004. Crystal structure of LeuA from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in leucine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:8295-8300.

第 6 章

代謝改変酢酸菌を用いたショウジョウバエ誘引素材の開発

第 1 節 緒言

Drosophila melanogaster に代表されるショウジョウバエは、腐敗果実や食品に寄生し繁殖する事から、都市部における不衛生指標の一つとして認識されている。特に食品産業において、ショウジョウバエの発生は異物混入の原因となりうるため、その個体数を常に低い水準に維持する事は、重要な課題の一つであると言える。近年、*D. melanogaster* の近縁種 *Drosophila suzukii* (spotted-wing drosophila, SWD) による果樹栽培における深刻な農業被害が欧米を中心に報告されている(1-3)。SWD は東南アジアに起源を持つショウジョウバエであり、雄は羽に特徴的な模様(黒い丸印)を持つ事から、SWD と呼ばれる。2000 年代に貿易を通じて欧米に伝播されたと考えられる、認知されて間もない害虫であるが、既に欧米の広範な地域で農業被害をもたらしている(1)。一般にショウジョウバエは腐敗した果実や食品のみに寄生するが、SWD は他種ショウジョウバエとは異なり、非常に鋭い鋸歯状の産卵管を備えているため、成熟前の若い果実(ブルーベリー、イチゴ、桃等)にも産卵する事が出来る(1)。結果として、寄生された果実は収穫前の段階で既に著しい損傷を受ける。SWD による損傷箇所では微生物の繁殖、それに伴う腐敗が進行するため、その腐敗箇所に他種ショウジョウバエが二次感染する事で、果実の劣化は更に進む。他の病虫害に対する防除同様に、SWD が発見された場合迅速な殺虫剤散布が必要となるが、薬剤散布の回数が増える程、残留農薬の量が許容される閾値を超える危険性も高まるため、加工プラントや輸出ターミナルで収穫物の受け入れを拒否される可能性も必然的に高くなる(4)。果樹栽培での SWD による経済損失が試算され、その額は北米で年間 5 億ドル、南欧で 300 万ユーロに上ると推測されている(5, 6)。従って、この SWD による莫大な経済損失を防ぐためには、体系的な防除プログラムの確立が急務であり、その第一歩として、

SWD 及び他種ショウジョウバエの集団数を的確に把握するための効率的な捕虫器開発が求められている。

近年、安全・安心を求める消費者動向に応じる形で、化学成分の代わりに発酵食品を誘引剤原料として用いた、一般家庭向けのショウジョウバエ捕虫器が開発され、広く市場に流通する様になった。発酵食品の中でも、食酢及びワインは、強力なショウジョウバエ誘引作用を有する事が知られている(7, 8)。ガスクロマトグラフィーにより分離した成分を昆虫の触角に接触させ、触角先端及び基部間に生じる電位差を検出する事で生理活性物質を探索する手法 (gas chromatography coupled with electroantennographic detection, GC-EAD)により、食酢及びワインに含まれる、ショウジョウバエ誘引作用を有する揮発性成分がいくつか同定されている(6, 9, 10)。中でも、食酢の主成分である酢酸は、非常に強いショウジョウバエ誘引作用を有する(6, 8, 11)。また、多くの乳製品に含まれる、チーズ或いはバター様の重い臭気を持つアセトイン(12)は、酢酸と共に強力なショウジョウバエ誘引効果を発揮する(6, 10)。両物質は、ショウジョウバエに餌及び産卵場所を伝達するシグナル分子であると考えられている(11)。従って、著量のアセトインを含有する食酢は、より効率的にショウジョウバエを誘引する事が期待される。

Komagataeibacter europaeus や *Acetobacter pasteurianus* に代表される酢酸菌は、主に食酢の工業生産に用いられる産業上重要な微生物である。その一方で、序論でも記述した様に、種々のユニークな特徴を利用した、酢酸菌を食酢製造以外へ応用する試みが多数報告されており(13-16)、食酢の捕虫器原料としての利用も、その一環であると言える。第3章において、*K. europaeus* における、ウラシル要求性を指標とした遺伝子破壊技術を確立すると同時に、同酢酸菌におけるアセトイン合成経路を同定した(17)。同経路は、分岐鎖アミノ酸(branched-chain amino acid, バリン, ロイシン, 及びイソロイシン)生合成経路と、一部の間接代謝物(ピルビン酸及び α -アセト乳酸)を共有する(図 6.1)。 *K. europaeus* によるアセトイン高生産を検討する際、アセトヒドロキシ酸イ

ソメロレダクターゼ(acetohydroxyacid isomeroeductase, AHAIIR)遺伝子(*ilvC*)の破壊は、炭素の流れがバリンからアセトイン合成へ遷移する事が期待されるため、有効な手段の一つであると考えられる(図 6.1). また、第 5 章における研究から、転写因子 leucine responsive regulatory protein (*KeLrp*) は、アセトヒドロキシ酸シンターゼ(acetohydroxyacid synthase, AHAS)遺伝子(*ilvIH*) (図 6.1)の転写を抑制しており、*KeLrp* C 末端領域の推定リガンド結合部位を特異的に欠損させる事で、その転写抑制効果が消失し、*ilvIH* 転写量が著しく上昇する共に、BCAA 生産能が付与される事が明らかとなった(18). 従って、この変異を有する *K. europaeus* KGMA7203 株(Δ *pyrE Kelrp* Δ (397-511)::*pyrE*)は、BCAA 生産の副産物として、アセトインを蓄積する事が期待される(図 6.1).

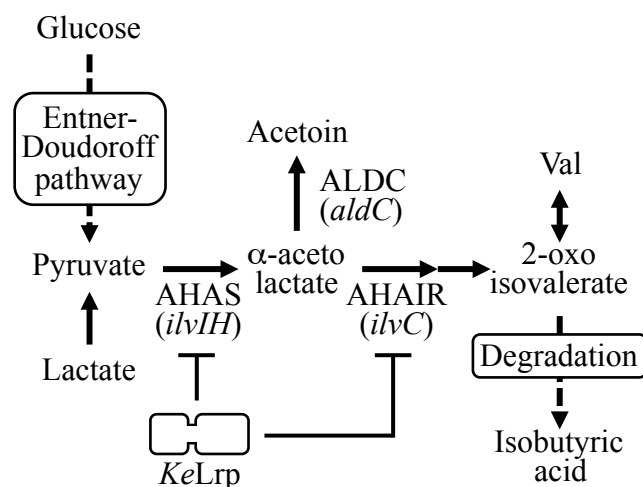


図6.1. *K. europaeus*のアセトイン及びイソ酪酸合成経路. 両物質の合成経路は、バリン生合成経路と中間代謝物を共有する. AHAS, acetohydroxyacid synthase; AHAIIR, acetohydroxyacid isomeroeductase; ALDC, α -acetolactate decarboxylase; *KeLrp*, leucine responsive regulatory protein.

ショウジョウバエに対する誘引性を向上させる際、原料(発酵食品)の変更や、それらの混合比率を変更する事は有効な手段の一つであろう. 実際に、様々な発酵食品(米酢、バルサミコ酢や種々のアルコール飲料)を原料とした捕虫器が販売されている. 一方で、食酢そのものの誘引性を向上させる試みはこれまでなされていない. これらを踏まえ、代謝改変により *K. europaeus* のアセトイン生産能を向上させる事で、食酢

の持つショウジョウバエ誘引作用の増強を図った。得られた代謝改変酢酸菌の培養液上清を用いて捕虫実験を行い、各々のショウジョウバエ誘引作用を検証した。

第 2 節 実験材料及び方法

供試株及び培地

本章において供試した菌株及びプラスミドを表 6.1 に記載した。第 5 章において構築された *K. europaeus* KGMA7203 株($\Delta pyrE$ *KeLrp* Δ (397-511)::*pyrE*)はバリン及びロイシン生産株であり、C 末端領域に位置する推定リガンド結合部位を欠損した変異型 *KeLrp* を発現すると推測されている (18)。 *K. europaeus* の培養には、yeast-peptone-dextrose (YPD)培地(19)又は最少培地(19)を用いた。培養は全て 30°C で行い、液体培養の際は往復振盪 150 rpm で行った。特に明記しない限り、両培地に 0.4% (wt/vol)エタノール及び 0.5% (wt/vol)酢酸を加えて培養を行った。固形培地での培養の際は、YPD 培地に 9 g/l の寒天を加えたものを用いた。*ilvC* 破壊株の選抜及び培養には、必要に応じて、両培地に 12 mM BCAA(バリン, ロイシン, 及びイソロイシン)を添加した(下記参照)。*ilvC* 破壊ベクターの構築には、大腸菌 DH5 α 株(タカラバイオ, 滋賀) (20)及びプラスミド pBR322 (21)を用いた。DH5 α 株の培養には 50 μ g/ml アンピシリンを添加した Lysogeny broth (LB 培地) (22)を用い、37°C で培養した。

DNA 操作及びシーケンス解析

一般的な DNA 操作に関する手法は既報(22)に準拠した。PCR の際の DNA ポリメラーゼとして、KOD plus (東洋紡, 大阪)を用いた。PCR プライマーは、タイプ株 LMG 18890^T 株のドラフトゲノム配列(23)を基に設計した。制限酵素及び各種修飾酵素は、タカラバイオ又はニッポン・ジーン(東京)より購入した。アガロースゲル電気泳動後の標的 DNA の精製には、NucleoSpin Gel and PCR Cleanup Kit (タカラバイオ)を用いた。

プラスミド DNA の抽出は、アルカリ抽出法(22)又は Plasmid Midi Kit (キアゲン社, ドイツ)を用いて行った. DNA シーケンス解析は, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 及び Model 3130 Capillary Sequencer (共にアプライド・バイオシステムズ社, アメリカ合衆国)を用いて行った.

表6.1. 供試菌株, プラスミド, 及びプライマー

株・プラスミド・ プライマー	特徴又は配列(5' - 3') ^a	出典又は 目的
<i>E. coli</i>		
DH5α	F ⁻ , Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	20
<i>K. europaeus</i>		
KGMA0119株	食酢発酵液より単離(野生株)	19
KGMA0704株	KGMA0119株由来 <i>pyrE</i> 欠失株(Δ <i>pyrE</i>)	17
KGMA5511株	KGMA0704株由来 <i>ilvC</i> 破壊株(Δ <i>pyrE</i> Δ <i>ilvC::pyrE</i>)	本研究
KGMA7203株	KGMA0704株由来 <i>KeLrp</i> C末端領域欠損株(Δ <i>pyrE</i> <i>KeLrp</i> Δ(397-511):: <i>pyrE</i>)	18
プラスミド		
pBR322	Amp ^r	21
pBR322-Δ <i>ilvC::pyrE</i>	pBR322由来 <i>ilvC</i> 破壊ベクター(図6.3参照)	本研究
プライマー		
<i>ilvC</i> -F	<u>AAGAATTCTCACGGTATTCCGAAAGCTACAGT</u>	<i>ilvC</i> 破壊
<i>ilvC</i> -R	<u>AAGGATCCGTATTTCAGGCGGTATAGGTGACGTT</u>	<i>ilvC</i> 破壊
<i>ilvC</i> -i1	ATGATGTCATGGATCGGCAAGAACAAGCTG	<i>ilvC</i> 破壊
<i>ilvC</i> -i2	ATCGCGATCGTAATAGACGCGCATGGTCTT	<i>ilvC</i> 破壊
EP-F2	CTGCCATATCCCGTGTTCGT	<i>pyrE</i> マーカー
E-R4	TCGCCATAGGGAAAGACTGC	<i>pyrE</i> マーカー
<i>ilvC</i> -F2	GTGGATACAATATCGAAAGCCTGAC	遺伝子型同定
<i>ilvC</i> -R2	CTGGCTTGAAAAGAAGAAAGGTTT	遺伝子型同定

^a 制限酵素認識配列を下線で示した.

***ilvC* 破壊ベクター及び *ilvC* 破壊株の構築**

*ilvC*破壊ベクター構築に用いたプライマーを、**図 6.3** 及び**表 6.1**に記載した。遺伝子破壊は、破壊ベクターとの相同組換え(double crossover homologous recombination)により行った。KGMA0704 株($\Delta pyrE$)及びオロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(*pyrE*)を、それぞれ遺伝子破壊実験における宿主及び選抜マーカーとして用いた(17)。また、*ilvC* 及び *pyrE* 遺伝子を含む領域の PCR 増幅には、鋳型として KGMA0119 株(野生株)の全 DNA を用いた。DNA 断片の連結は、DNA リガーゼ(Ligation-Convenience Kit, ニッポン・ジーン)を用いて行った。必要に応じ、プライマーの 5'末端を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ(タカラバイオ)を用いてリン酸化した。5'末端をリン酸化した EP-F2 及び E-R4 を用いて、*pyrE* 翻訳領域(open reading frame, ORF) 及びそのプロモーターを含む 1.5 kb の領域(*pyrE* マーカー)を PCR 増幅した(**図 6.3A**)。次に、*ilvC* ORF 及びその 5'側上流(1.0 kb)及び 3'側下流領域(0.9 kb)を含む 2.8 kb の領域を、*ilvC*-F 及び *ilvC*-R を用いて PCR 増幅した(**図 6.3A**)。得られた PCR 産物及び pBR322 を EcoRI 及び BamHI で消化した後、両者を連結した。得られた中間プラスミドを鋳型とし、*ilvC*-i1 及び *ilvC*-i2 を用いたインバース PCR(**図 6.3A**)を行う事で、*ilvC* ORF の 945 bp を除去した。得られた PCR 産物、及び 5'末端をリン酸化した *pyrE* マーカーを連結し、*ilvC* 破壊ベクター(pBR322- $\Delta ilvC::pyrE$)とした(**図 6.3A**)。

pBR322- $\Delta ilvC::pyrE$ を、既報(第 3 章参照) (17)に従い KGMA0704 株に導入し、ウラシル原栄養性かつ BCAA 要求性株を選抜した。候補株の遺伝子型は、*ilvC*-F2 及び *ilvC*-R2 を用いた PCR(**図 6.3A**)、及び得られた PCR 産物のシーケンス解析により同定した。得られた *ilvC* 破壊株を、KGMA5511 株($\Delta pyrE \Delta ilvC::pyrE$)とした(**図 6.3A**)。

揮発性成分及び有機酸の定量、及び捕虫実験に用いる培養液上清の調製

KGMA0119 株、KGMA5511 株、及び KGMA7203 株(18)を、1.0% (wt/vol) L-乳酸ナトリウムを添加した 30 ml YPD 培地(KGMA5511 株の培養の際は、更に 12 mM BCAA を添

加)で培養し、培養液を経時的に採取した。そこから、遠心分離(4°C, 10,000 × g, 5分)及びフィルター濾過(孔径 0.45 μm, Millex LH filter, ミリポア社, アメリカ合衆国)を行う事で培養液上清を得た。培養液上清中の酢酸, エタノール, 及びアセトインは, GC (GC-2014, 島津製作所, 京都)により定量した。成分の分離にはパックド・カラム (polyethylene glycol 20M 10% ShinCarbon A 60/80 2.1 m × 3.2 mm, 信和化工, 京都)を用いた。カラム・オープンの温度は, 60°Cで3分間保持した後, 昇温速度 10°C/分で 200°Cまで上昇させた。

培養液上清中の有機酸は, 高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography, HPLC, 有機酸分析システム・プロミネンス, 島津製作所)により定量し, 成分の分離にはイオン排除カラム(Shim-pack SCR-102H, 島津製作所)を用いた。カラムを移動相(5 mM *p*-トルエンスルホン酸)で平衡化(40°C, 流速 0.8 ml/分)した後, 培養液上清をインジェクションした。カラムより溶出された有機酸を反応液(5 mM *p*-トルエンスルホン酸, 100 μM ethylenediamine tetraacetic acid [EDTA], 及び 20 mM bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane [Bis-Tris])と混和し(40°C, 流速 0.8 ml/分), 電気伝導度検出器(CDD-10AVP, 島津製作所)を用いて検出した。

34 時間の培養で得られた培養液上清を, 以降の捕虫実験に供試した。

ショウジョウバエの飼育

捕虫実験には, 首都大学東京より分譲された *D. melanogaster* を用いた。ショウジョウバエの餌として, バナナ培地(10 g ペースト状バナナ, 0.5 g 乾燥パン酵母[オリエンタル酵母, 東京], 及び 3 ml ビール[キリン, 東京])を用いた。初めに, 6 ml のバナナ培地を添加した 30 ml ガラスバイアルにショウジョウバエを移し, 綿栓により蓋をして, 室温(22–25°C)で 10–14 日間飼育した。ショウジョウバエ個体集団を維持するため, 新たに孵化した成虫を, 上記同様のバナナ培地を添加したガラスバイアルに移した。この作業を, 10 日毎に行った。捕虫実験に供試するため, 30 ml ガラスバイアル中の成虫,

幼虫, 及び蛹を, バナナ培地を添加した 5 L ガラスボトルに移し, 個体数が約 1,500 匹に到達するまで, 更に 5-10 日間飼育した. 得られたショウジョウバエを, 捕虫実験に供試した.

捕虫実験

捕虫実験は, 2014 年 7 月 1 日及び 9 日(1 回目の試行) (図 6.7), 及び 2014 年 10 月 9 日及び 20 日(2 回目の試行) (図 6.8)の日中に, 兵庫県三田市において行った(共に $N=3$). 1 回目及び 2 回目の捕虫実験の際の外気温は, それぞれ 28°C 及び 25°C であった. 捕虫トラップとして, ビクターフライマグネット(ウッドストリーム社, アメリカ合衆国)に下記改変を加えたものを用いた. すなわち, 円筒状に成形した粘着シート(11 cm × 21 cm, 三共消毒, 東京)をプラスチックボトル開口部に備え付け, そこへ培養液上清を添加した(図 6.2A). ショウジョウバエ侵入口及び揮発性成分の拡散を促進するための傘が付いた蓋でボトル開口部を閉じ, 捕虫実験に用いるトラップとした(図 6.2A). 0.7% (wt/vol)酢酸, 0.13% (wt/vol)アセトイン, 及び 0.007% (wt/vol)イソ酪酸からなる水溶液(合成酢)を対照として用いた. 捕虫実験は蚊帳を張ったテント内で行った(図 6.2B). トラップを, 地面から 1 m の高さとなる様テントの四隅に吊した(図 6.2B, 矢印).

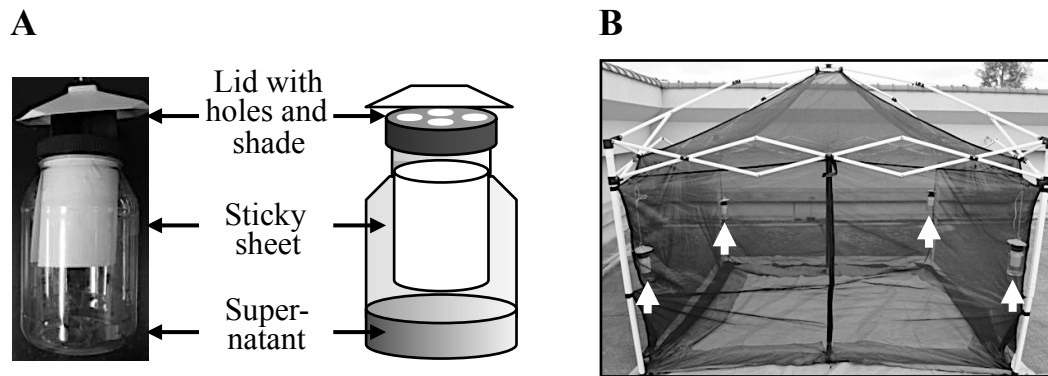


図6.2. 捕虫実験に用いたトラップ及び資材. (A) 捕虫トラップ. ビクター・フライマグネット(ウッドストリーム社)の捕虫ボトル内部に粘着シートを貼り, 培養液上清を誘引剤として添加したものをトラップとして用いた. (B) 捕虫実験に用いたテント. ショウジョウバエの飛散を防止するため, テントに蚊帳を張り実験を行った. トラップは, テントの四隅, 地面から1 mの高さに設置した(白矢印).

飼育した約 1,500 匹のショウジョウバエをテント内で放ち, 粘着シート上の捕捉されたショウジョウバエを 15 分毎に計測し, 計 45 分間捕虫実験を行った. その後, トラップに捕捉されなかったショウジョウバエを殺虫剤で殺し, それらを計測した. 得られた値と, トラップに捕捉された個体の数を合算する事で, テント内に放ったショウジョウバエの総数を算出した. 培養液上清の誘引性は, テント内に放ったショウジョウバエ個体総数に対する, トラップに捕捉された個体数の割合(%)で示した(下記).

$$\frac{[\text{トラップに捕捉された個体数}]}{[\text{テント内に放った個体総数}]} (\%)$$

塩基配列のアクセッション番号

ilvC 及び *Kelrp* の塩基配列は, それぞれ AB899162 及び AB899159 のアクセッション番号の下, データベース DDBJ, EMBL, 及び GenBank に登録された.

第3節 結果

ilvC 破壊株の構築

図 6.1 に示した様に, *K. europaeus* のアセトイン合成経路は, BCAA 生合成経路と中間代謝物を共有する. 従って, *ilvC* 遺伝子の破壊によりバリン生合成経路を遮断する事で, アセトイン生産量の増加が期待された. *ilvC* 破壊ベクター(pBR322- $\Delta ilvC::pyrE$)を KGMA0704 株($\Delta pyrE$)に導入し, ウラシル原栄養性かつ BCAA 要求性株を選抜した(図 6.3A). 得られた *ilvC* 破壊株を KGMA5511 株($\Delta pyrE \Delta ilvC::pyrE$)とし(図 6.3A), その遺伝子型を確認するためプライマー *ilvC*-F2 及び *ilvC*-R2 を用いて KGMA0119 株(野生株), KGMA0704 株, 及び KGMA5511 株の *ilvC* 遺伝子座を PCR 増幅したところ, KGMA5511 株からは野生株及び親株よりも長い DNA 断片が増幅された(図 6.3B). また, 得られた PCR 産物のシーケンス解析の結果, KGMA5511 株の *ilvC* ORF が *pyrE* 遺伝子により置換されている事が確認された.

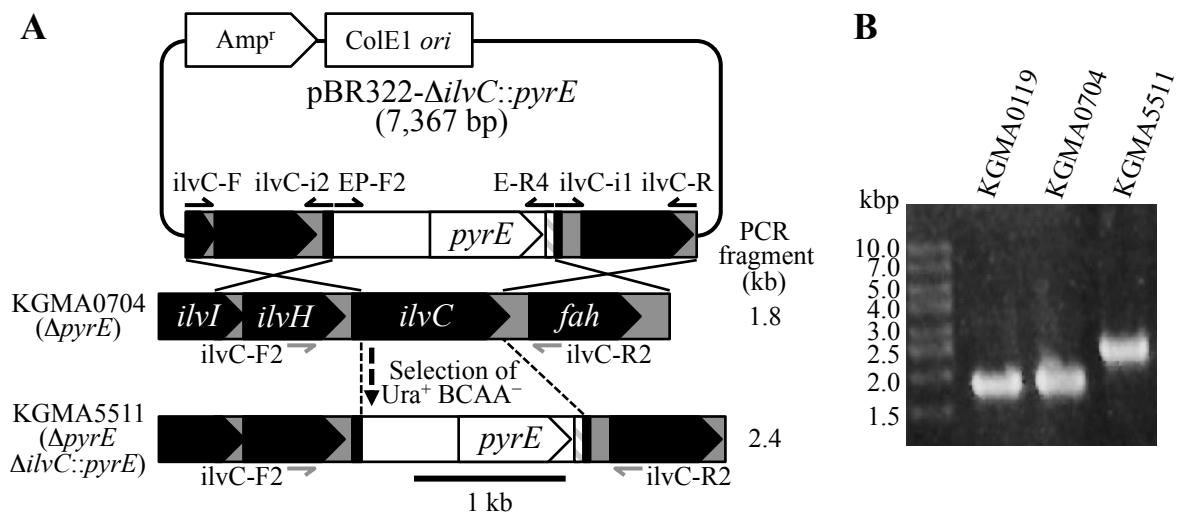


図6.3. *ilvC*破壊株の構築. (A) *ilvC*破壊株の構築. *ilvC*破壊ベクター(pBR322- $\Delta ilvC::pyrE$)をKGMA0704株($\Delta pyrE$)へ導入し、ウラシル原栄養かつBCAA要求性株を選抜した. 得られた*ilvC*破壊株をKGMA5511株($\Delta pyrE \Delta ilvC::pyrE$)とした. 破壊ベクター構築及び遺伝子型同定に用いたPCRプライマーを、それぞれ黒矢印及び灰色矢印で示した. 遺伝子型同定の際に増幅されるPCR産物の長さを模式図右に示した. *ilvI*, acetohydroxyacid synthase large subunit; *ilvH*, acetohydroxyacid synthase small subunit; *ilvC*, acetohydroxyacid isomeroreductase; *fah*, fumarylacetoacetate hydroxylase. (B) *ilvC*破壊株の遺伝子型同定. KGMA0119株(野生株), KGMA0704株, 及びKGMA5511株の全DNAを鋳型とし、図6.3Aに示したプライマー(*ilvC*-F2 – *ilvC*-R2)を用いて*ilvC*遺伝子座をPCR増幅した.

KGMA5511株はその正常な生育のために高濃度(12 mM)のBCAAを要求し(図 6.4A), 富栄養培地(YPD 培地)で培養した際も, BCAA 非添加条件下では著しい生育遅延を示した(図 6.4B). より低濃度(0.5 mM 及び 4 mM)のBCAA 添加では上記生育遅延は解消されなかったため(図 6.4B), 同株を培養する際には常に 12 mM BCAA を添加した培地を用いた.

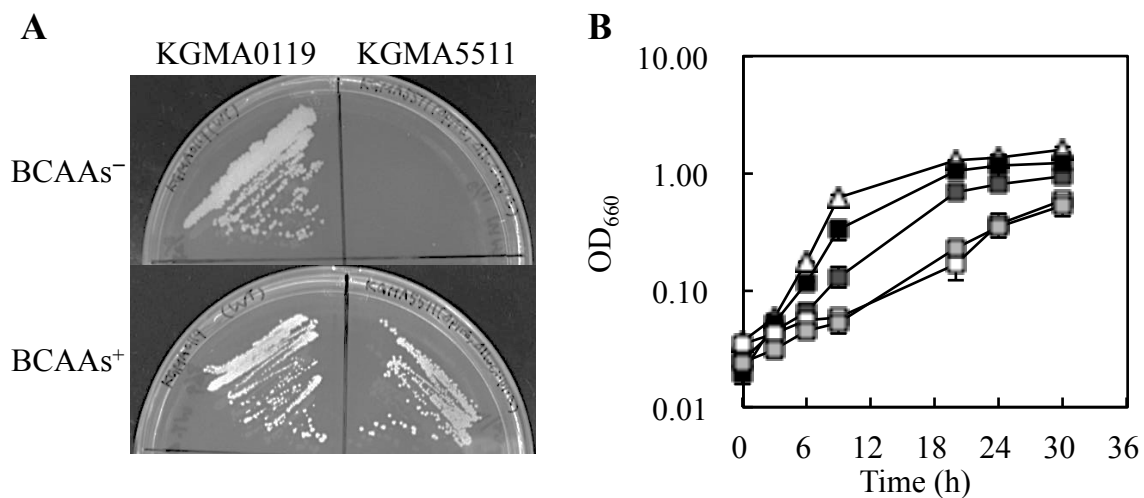


図6.4. *ilvC*破壊株のBCAA要求性. (A) *ilvC*破壊株のBCAA要求性. KGMA0119株(野生株)及びKGMA5511株($\Delta pyrE \Delta ilvC::pyrE$)を, 12 mM BCAA(バリン, ロイシン, 及びイソロイシン)を含まない(上段), 或いは含む(下段)最少寒天培地に画線した. 左, KGMA0119株; 右, KGMA5511株. (B) *ilvC*破壊株の富栄養培地における生育特性解析. KGMA5511株を種々の濃度のBCAAを含まない, 或いは含むYPD培地で培養した. 対照実験として, KGMA0119株をBCAA非添加のYPD培地で培養した. 白三角, KGMA0119株(BCAA非添加); 白四角, KGMA5511株(BCAA非添加); 薄灰色四角, KGMA5511株 + 0.5 mM BCAA; 濃灰色四角, KGMA5511株 + 4 mM BCAA; 黒四角, KGMA5511株 + 12 mM BCAA. エラーバーは標準偏差を表す($N=3$).

培養液に蓄積した揮発性成分及び有機酸の定量

KeLrp C 末端領域の推定リガンド結合部位を欠損させる事で, *ilvIH* の転写量が著しく上昇する事を第5章において詳述した(18). 従って, 同変異を有する KGMA7203 株 ($\Delta pyrE \text{ KeLrp}\Delta(397-511)::pyrE$)は, BCAA 生産の副産物としてアセトインを蓄積すると予測された(図 6.1). これを検証するため, KGMA0119 株, KGMA5511 株, 及び KGMA7203 株を L-乳酸ナトリウムを含む YPD 培地(KGMA5511 株の培養には, 更に 12 mM BCAA を添加)で培養し, 培養液中の酢酸, エタノール, 及びアセトイン量を GC により定量した. その結果, いずれの株も対数期後期からアセトインの蓄積を開始したが, KGMA5511 株(0.11%)及び KGMA7203 株(0.13%)は, 34 時間の培養で野生株(0.069%)よりも多くのアセトインを蓄積した(図 6.5B). 一方, これら 3 株のエタノー

ル酸化能及び酢酸生産能に顕著な差異は見られず、34 時間の培養でどの株も約 0.7% の酢酸を蓄積した(図 6.5C 及び D).

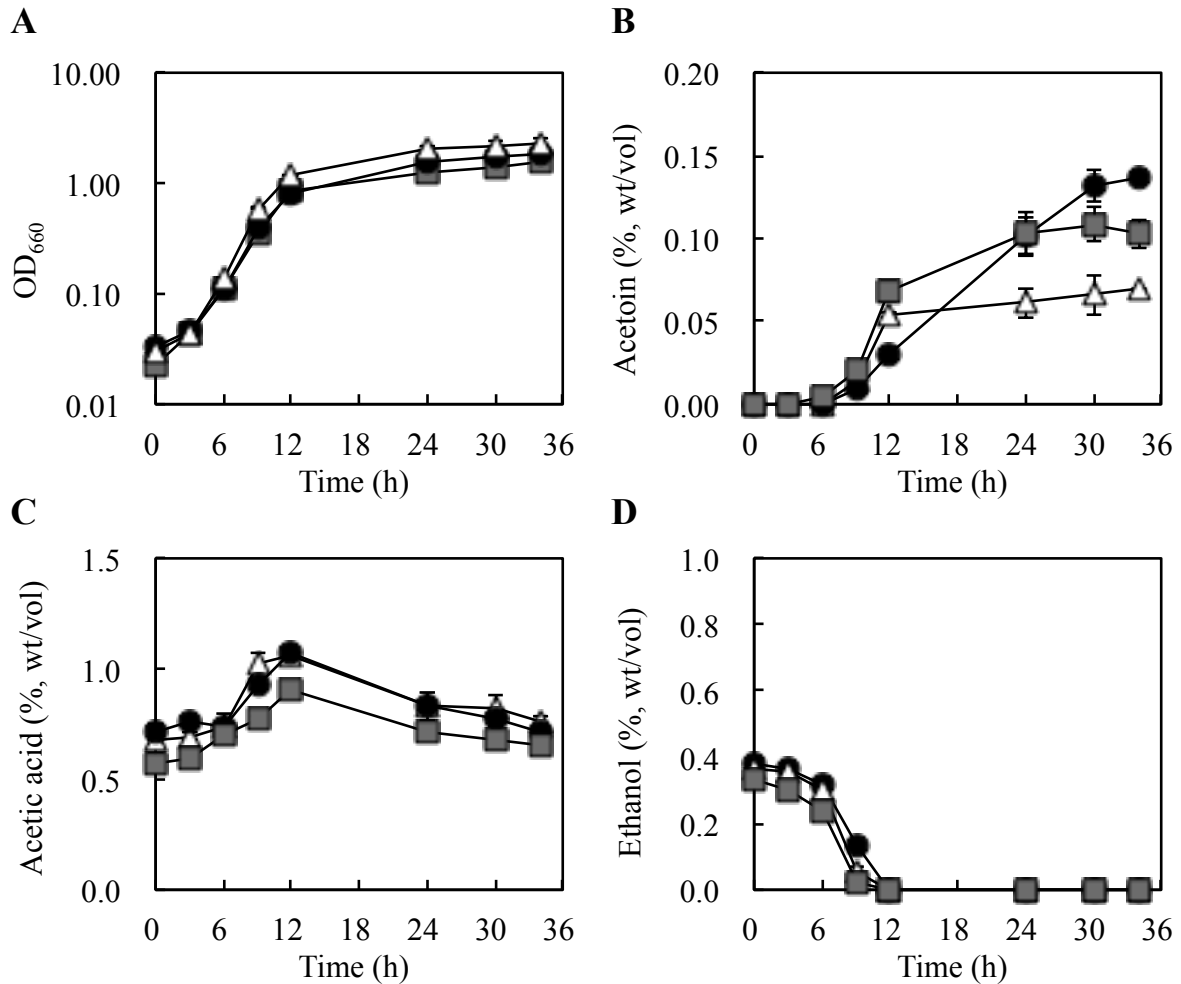


図6.5. 遺伝子破壊株培養液に蓄積した揮発性成分の分析. KGMA0119株(野生株), KGMA5511株($\Delta pyrE \Delta ilvC::pyrE$), 及びKGMA7203株($\Delta pyrE Kelrp\Delta(397-511)::pyrE$)を1.0% L-乳酸ナトリウムを含むYPD培地(KGMA5511株の培養の際は, 更に12 mM BCAA [バリン, ロイシン, 及びイソロイシン]を添加)で培養し, 培養液中のアセトイン, 酢酸, 及びエタノールをGCにより定量した. (A) OD₆₆₀. (B) アセトイン (% wt/vol). (C) 酢酸 (% wt/vol). (D) エタノール (% wt/vol). 白三角, KGMA0119株; 灰色四角, KGMA5511株; 黒丸, KGMA7203株. エラーバーは標準偏差を表す(N=3).

より詳細に培養液組成を調べるため, 34 時間の培養で得られた培養液の有機酸組成を, HPLC により解析した. その結果, KGMA7203 株のみが微量のイソ酪酸(0.007%)を

蓄積している事が明らかとなった(図 6.6). 一方, 他の有機酸に関しては, 3株間で顕著な差異は観察されなかった(図 6.6). これらを踏まえ, 34 時間培養で得られた培養液上清を以降の捕虫実験へ供試し, 各々のショウジョウバエ誘引能を検証した.

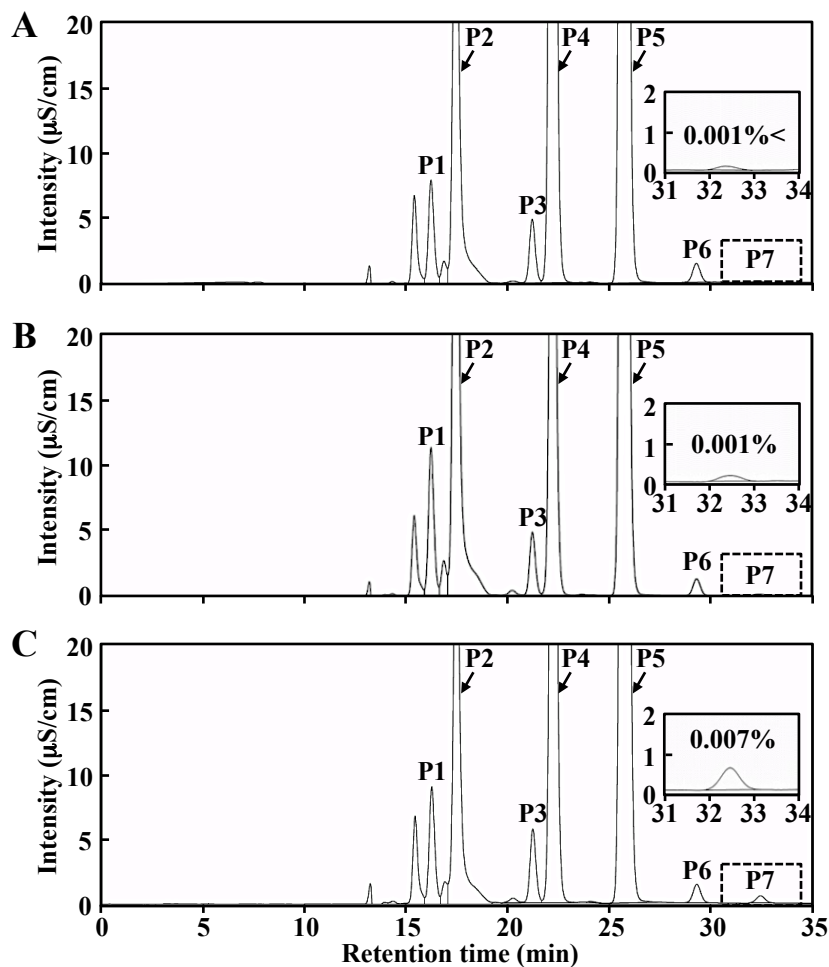


図6.6. 遺伝子破壊株培養液に蓄積した有機酸の液体クロマトグラム. KGMA0119株(野生株), KGMA5511株($\Delta pyrE \Delta ilvC::pyrE$), 及びKGMA7203株($\Delta pyrE Kelrp\Delta(397-511)::pyrE$)を1.0% L-乳酸ナトリウムを含むYPD培地(KGMA5511株の培養の際には, 更に12 mM BCAA [バリン, ロイシン, 及びイソロイシン]を添加)で34時間培養し(図6.5参照), 培養液中の有機酸をHPLCにより定量した. 破線で示した領域(31-34分)を拡大表示した. ピーク: P1, クエン酸(16.3分); P2, グルコン酸(17.5分); P3, コハク酸(21.2分); P4, 乳酸(22.2分); P5, 酢酸(25.8分); P6, プロピオン酸(29.3分); P7, イソ酪酸(32.5分). (A) KGMA0119株. (B) KGMA5511株. (C) KGMA7203株.

捕虫実験

上記の通り調製した培養液上清を用いて、捕虫実験を行った。対照として、KGMA7203株培養液組成を模した合成酢(0.7%酢酸, 0.13%アセトイン, 及び0.007%イソ酪酸)を併せて供試した。実験の結果、合成酢の誘引性は極めて低く、供試したショウジョウバエの $2.33 \pm 1.61\%$ を捕捉するにとどまった(図 6.7)。対照的に、KGMA7203株の培養液上清は最も高い誘引性を示し、45 分間の捕虫実験で、 $28.70 \pm 7.23\%$ のショウジョウバエを捕捉した(KGMA0119 株, $8.36 \pm 3.63\%$; KGMA5511 株, $13.56 \pm 7.17\%$) (図 6.7)。

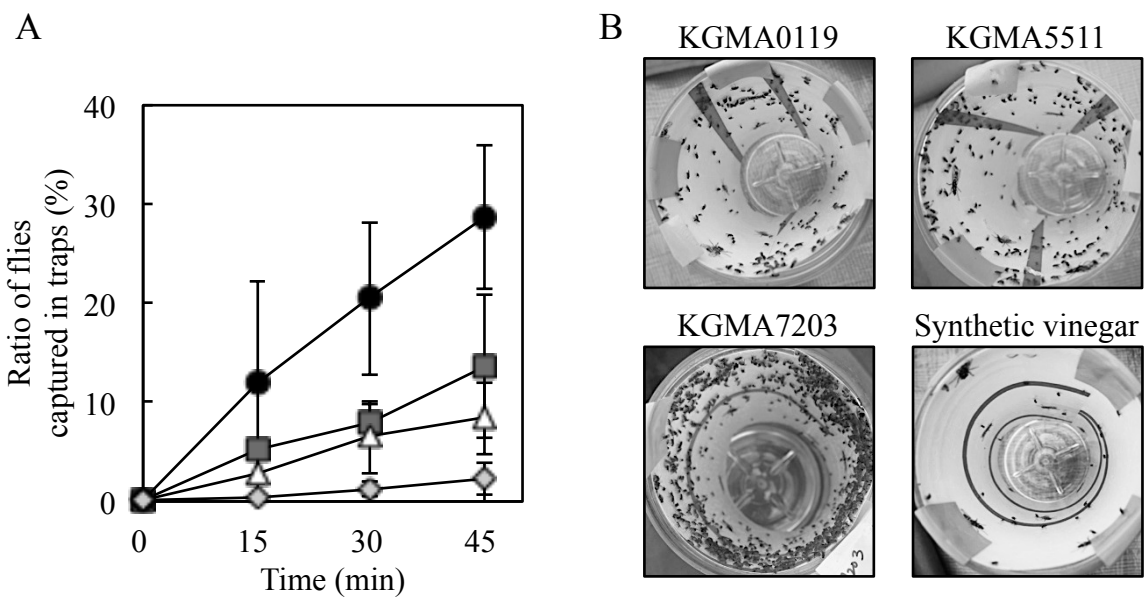


図6.7. 捕虫実験(2014年7月1日及び9日実施). KGMA0119株(野生株), KGMA5511株($\Delta pyrE \Delta ilvC::pyrE$), 及びKGMA7203株($\Delta pyrE Kelrp\Delta(397-511)::pyrE$)を1.0% L-乳酸ナトリウムを含むYPD培地(KGMA5511株の培養の際は, 更に12 mM BCAA[バリン, ロイシン, 及びイソロイシン]を添加)で34時間培養した後, 培養液上清を供試して捕虫実験を行った. (A) 培養液上清のショウジョウバエ誘引性. 各株培養液上清の誘引性を, テント内に放ったショウジョウバエ個体総数に対する, トラップに捕捉された個体数の割合(%)で示した. 白三角, KGMA0119株; 濃灰色四角, KGMA5511株; 黒丸, KGMA7203株; 薄灰色ダイヤモンド, 合成酢(0.7%酢酸, 0.13%アセトイン, 及び0.007%イソ酪酸). エラーバーは標準偏差を表す($N=3$). (B) 45分間の捕虫実験で捕捉されたショウジョウバエ(図6.7A参照).

アセトイン濃度がほぼ同等の KGMA5511 株及び KGMA7203 株の培養液上清間で誘引性に差がみられた事から, KGMA7203 株上清の高いショウジョウバエ誘引能は, 酢酸, アセトイン, 及びイソ酪酸の相乗効果に起因するものと推測された. これを検証するため, KGMA0119 株培養液上清にアセトイン及びイソ酪酸を添加し, それら終濃度を KGMA7203 株上清の含有濃度と等しくしたもの(アセトイン, 0.13%; イソ酪酸, 0.007%)を調製し, その誘引性を検証した. その結果, アセトイン及びイソ酪酸を添加した KGMA0119 株上清は, 添加していない KGMA0119 株上清よりも多くのショウジョウバエを捕捉したが, 依然として KGMA7203 株上清が最も高いショウジョウバエ誘引性を示した(図 6.8).

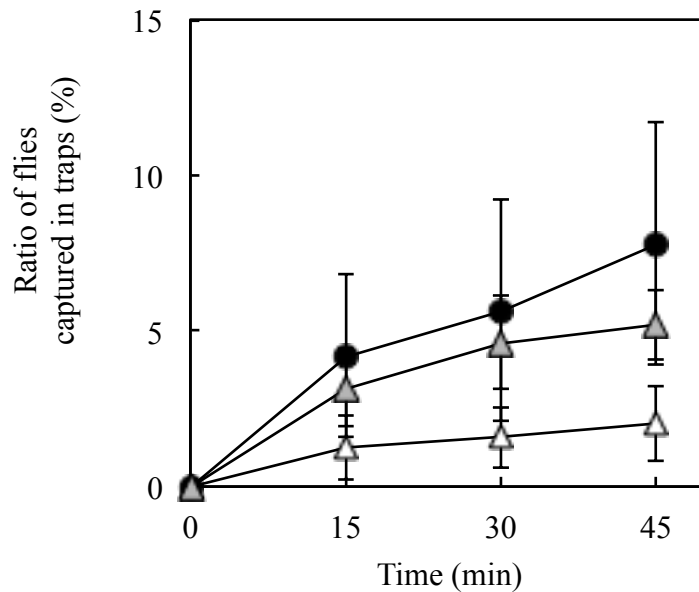


図6.8. 外部より添加したアセトイン及びイソ酪酸のショウジョウバエ誘引作用への影響(2014年10月9日及び20日実施). KGMA0119株(野生株)及びKGMA7203株($\Delta pyrE$ *Kelrp* Δ (397-511)::*pyrE*)を1.0% L-乳酸ナトリウムを含むYPD培地で34時間培養し, その培養液上清を捕虫実験に供試した(図6.5及び6.6参照). 更に, KGMA0119株培養液上清にアセトイン及びイソ酪酸を加え, 終濃度をそれぞれ0.13%及び0.007%に調整する事で, KGMA7203株培養液上清を模した上清を調製した. 各株培養液上清の誘引性を, テント内に放ったショウジョウバエ個体総数に対する, トラップに捕捉された個体数の割合(%)で示した. 白三角, KGMA119株; 灰色三角, KGMA0119株+アセトイン(0.13%)及びイソ酪酸(0.007%); 黒丸, KGMA7203株. エラーバーは標準偏差を表す(N=3).

第4節 考察

食酢のショウジョウバエ誘引性を増強するため, 強力なショウジョウバエ誘引作用を有するアセトインに着目し, 代謝改変により2種のアセトイン高生産株を構築した(図6.5). そのうち, 第5章において構築された, *KeLrp* C末端領域の推定リガンド結合部位を欠損させたKGMA7203株($\Delta pyrE$ *Kelrp* Δ (397-511)::*pyrE*)の培養液上清が最も高いショウジョウバエ誘引性を発揮した(図6.7及び6.8). KGMA5511株($\Delta pyrE$ $\Delta ilvC$::*pyrE*)及びKGMA7203株培養液上清に含まれるアセトイン濃度はほぼ同じであ

るにも関わらず、後者の誘引能がより高かった(図 6.7). また HPLC 解析の結果, KGMA7203 株のみが微量のイソ酪酸を蓄積していた(図 6.6). 既報(24)によれば, いくつかの短鎖カルボン酸(蟻酸や吉草酸等)はショウジョウバエ誘引能を有する事が知られている. これらを踏まえると, KGMA7203 株培養液上清の高いショウジョウバエ誘引性は, 酢酸, アセトイン, 及びイソ酪酸の相乗効果に起因する事が示唆される. また, 第 5 章で詳述した通り, KGMA7203 株は BCAA 生合成遺伝子を高発現するバリン及びロイシン生産株である(18). タイプ株 LMG 18890^T 株のゲノム解析(23)から, *K. europaeus* は他種微生物の持つ BCAA 分解経路(25)と類似の代謝経路を保持すると推測されている(図 6.1). この事から, KGMA7203 株培養液上清で検出されたイソ酪酸は, 同株が過剰に生産したバリン, 或いはその前駆体(2-オキシイソ吉草酸)(図 6.1)が分解される事で生じたと考えられる.

KGMA7203 株培養液上清を模した合成酢, 更に KGMA0119 株培養液上清にアセトイン及びイソ酪酸を添加する事で, 同様に KGMA7203 株培養液上清を模したものを調製し, それらの誘引性を検証したが, いずれの場合においても, KGMA7203 株上清がより高い誘引性を示した(図 6.7 及び 6.8). 大腸菌において, Lrp はアミノ酸代謝及び輸送に関与する多数の遺伝子群の発現を制御する転写因子であり, 巨大なレギュロンを形成している(26). Lrp の標的遺伝子の転写に及ぼす効果(転写促進又は抑制)は, リガンド分子であるロイシンが, C 末端領域に結合する事で調節を受ける. *K. europaeus* の Lrp オルソログである *KeLrp* も, 大腸菌 Lrp 同様, BCAA を含めたアミノ酸代謝を包括的に制御する事が第 5 章の研究より示唆されている(18). KGMA7203 株は *KeLrp* の C 末端領域を欠損した変異型 *KeLrp* を発現しているものと予想され, これにより同株はリガンド分子に対して非感受性であると推測される. 従って, *KeLrp* 制御系の下流に位置する多数の代謝経路が大きな影響を受けている事が示唆され, KGMA7203 株は, 本章研究では同定されなかった未知の誘引性物質を蓄積している可能性も考えられる. KGMA7203 株培養液上清を模したものが, KGMA7203 株培養液上清と同等の誘引

性を発揮出来なかった事は、この可能性を支持するものである。既報(6)によれば、メチオノールもショウジョウバエ誘引において、酢酸と共に相乗的に機能する。未知の誘引性代謝産物の同定には、更なる詳細な解析が必須である。

アセトインの生産性向上を図る上で、*ilvC* の破壊が有効である事が、本章研究により示された(図 6.5)。しかしながら、*ilvC* 破壊株である KGMA5511 株は、その正常な生育に高濃度(12 mM)の BCAA を要求した(図 6.4)。このような特性を持つ同株の使用は、プラント等での大規模生産を考慮する際、合理的な選択ではない。第4章において、*K. europaeus* の潜在型プラスミドを利用した遺伝子改変技術の基盤を確立した(27)。この技術を用いればアセトイン合成遺伝子の *in trans* 高発現も可能であり、これは *ilvC* 破壊と比較して、より合理的な手段であると考えられる。

1 回目の試行(図 6.7)及び 2 回目の試行(図 6.8)間で捕虫率に顕著な差異が見られ、KGMA7203 株培養液上清に着目すると、その誘引性は約 30%(図 6.7)から約 8%(図 6.8)に低下した。変温動物であるショウジョウバエの運動性は、気温の僅かな違いにより著しく影響を受ける(28)。2 回目の試行の際の外気温(25°C)は 1 回目(28°C)よりも低く、この事が、2 回目の試行における捕虫率低下の大きな要因であると考えられる。また、同一の培養液上清であっても、その誘引性に比較的大きなゆらぎ(標準偏差)が観察された(図 6.7 及び 6.8)。ショウジョウバエは概日時計を介して、外部環境要因の変動と自己の律動的活動(運動性や生理活性)を同調させている(29)。一般に、ショウジョウバエの運動性は、日の出及び日の入り時に最大となる(30)。本章研究では、1 回目及び 2 回目の試行(図 6.7 及び 6.8)共に、3 回の捕虫実験を行ったが($N=3$)、各々の実験開始時刻はそれぞれ異なる(データ示さず)。従って、本章で見られた誘引性のゆらぎは、概日時計により引き起こされた運動性の変動に起因するものと考えられる。しかしながら、いずれの捕虫実験においても、KGMA7203 株培養液上清は最も高いショウジョウバエ誘引性を示した(図 6.7 及び 6.8)。この事は、効率的な捕虫器開発における KGMA7203 株の優位性を示すものである。

効率的な捕虫器開発を達成するには、誘引剤の濃度、混合比率や蒸散速度、更には捕虫器の形状等の要因も最適化する必要がある(4, 31). また、食酢製造における原材料の選択も重要であろう. これまでの解析から、食酢の香味は使用する原材料及び菌株により著しく異なる事が明らかとなっている. 既報(7, 8)によれば、北米ではアップルサイダービネガーや米酢が、ショウジョウバエ捕虫器の誘引剤として好ましいとされている. SWD も、本章研究で用いた *D. melanogaster* 同様食酢に強く誘引される性質を持つ(6). KGMA7203 株は、SWD を含めたショウジョウバエ捕虫器を開発する上で、強力なプラットフォームとなる事が期待される(32).

第 5 節 要約

アセトインは、食酢主成分である酢酸と共に、強いショウジョウバエ誘引作用を發揮する. 食酢のショウジョウバエ誘引性を、アセトイン含有量を上昇させる事で増強するため、食酢製造酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ遺伝子(*ilvC*)を破壊する事で、アセトイン高生産株の構築を試みた. 第 5 章において構築された *Kelrp* 破壊株のアセトイン生産性も向上している事が期待されたため、本章研究に供試した. *ilvC* 破壊株である KGMA5511 株($\Delta pyrE \Delta ilvC::pyrE$), 及び *Kelrp* 破壊株である KGMA7203 株($\Delta pyrE Kelrp\Delta(397-511)::pyrE$)は、野生株 KGMA0119 株と比較して、著量のアセトインを培養液中に蓄積した(KGMA0119 株, 0.069%; KGMA5511 株, 0.11%; KGMA7203 株, 0.13%). 更に KGMA7203 株は微量のイソ酪酸(0.007%)を蓄積した. 酢酸蓄積量は、3 株間で差異は見られなかった(約 0.7%). これら培養液のショウジョウバエ誘引性を、飼育した *Drosophila melanogaster* を用いた捕虫実験により検証した. 蚊帳を張ったテント内に各株培養液上清及び粘着シートを備え付けたトラップを設置し、*D. melanogaster* (約 1,500 匹)を放ち、上清に誘引され粘着シートに捕捉された *D. melanogaster* 個体数を計測した. 対照として、0.7%酢酸,

0.13%アセトイン, 及び 0.007%イソ酪酸から成る, KGMA7203 株培養液上清を模した合成酢を用いた. KGMA7203 株培養液上清は最も高い誘引性を示し, 供試した *D. melanogaster* のうち, 28.70%を捕捉した(KGMA0119 株, 8.36%; KGMA5511 株, 13.56%; 合成酢, 2.30%). 更に, KGMA0119 株培養液上清にアセトイン及びイソ酪酸を添加し, それらの濃度を KGMA7203 株培養液上清(アセトイン, 0.13%; イソ酪酸, 0.007%)に合わせる事で KGMA7203 株培養液上清を模したものを調製し, この誘引性を検証した. その結果, アセトイン及びイソ酪酸を添加した KGMA0119 株培養液上清は, 添加しないものよりも多くの *D. melanogaster* を捕捉したが, 依然として KGMA7203 株培養液上清が最も高い誘引性を示した. これらの事から, KGMA7203 株培養液上清の高いショウジョウバエ誘引性は, 酢酸, アセトイン, イソ酪酸に加え, 未知のショウジョウバエ誘引性代謝産物の相乗効果に起因する事が示唆された.

引用文献

1. **Rota-Stabelli O, Blaxter M, Anfora G.** 2013. *Drosophila suzukii*. Curr. Biol. **23**:R8-R9.
2. **Hauser M.** 2011. A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in the continental United States, with remarks on their identification. Pest Manag. Sci. **67**:1352-1357.
3. **Lee JC, Bruck DJ, Curry H, Edwards D, Haviland DR, Van Steenwyk RA, Yorgey BM.** 2011. The susceptibility of small fruits and cherries to the spotted-wing drosophila, *Drosophila suzukii*. Pest Manag. Sci. **67**:1358-1367.
4. **Lee JC, Shearer PW, Barrantes LD, Beers EH, Burrack HJ, Dalton DT, Dreves AJ, Gut LJ, Hamby KA, Haviland DR, Isaacs R, Nielsen AL, Richardson T, Rodriguez-Saona CR, Stanley CA, Walsh DB, Walton VM, Yee WL, Zalom FG, Bruck DJ.** 2013. Trap designs for monitoring *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). Environ. Entomol. **42**:1348-1355.
5. **Beers EH, Van Steenwyk RA, Shearer PW, Coates WW, Grant JA.** 2011. Developing *Drosophila suzukii* management programs for sweet cherry in the western United States. Pest Manag. Sci. **67**:1386-1395.
6. **Cha DH, Adams T, Werle CT, Sampson BJ, Adamczyk JJ Jr, Rogg H, Landolt PJ.** 2014. A four-component synthetic attractant for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) isolated from fermented bait headspace. Pest Manag. Sci. **70**:324-331.
7. **Landolt PJ, Adams T, Rogg H.** 2012. Trapping spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae), with combinations of vinegar and wine, and acetic acid and ethanol. J. Appl. Entomol. **136**:148-154.
8. **Landolt PJ, Adams T, Davis TS, Rogg H.** 2012. Spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae), trapped with combinations of wines and vinegars. Fla. Entomol. **95**:326-332. doi: <http://dx.doi.org/10.1653/024.095.0213>

9. **Zhu J, Park KC, Baker TC.** 2003. Identification of odors from overripe mango that attract vinegar flies, *Drosophila melanogaster*. J. Chem. Ecol. **29**:899-909.
10. **Becher PG, Bengtsson M, Hansson BS, Witzgall P.** 2010. Flying the fly: long-range flight behavior of *Drosophila melanogaster* to attractive odors. J. Chem. Ecol. **36**:599-607.
11. **Cha DH, Adams T, Rogg H, Landolt PJ.** 2012. Identification and field evaluation of fermentation volatiles from wine and vinegar that mediate attraction of spotted wing *Drosophila*, *Drosophila suzukii*. J. Chem. Ecol. **38**:1419-1431.
12. **García-Quintáns N, Repizo G, Martín M, Magni C, López P.** 2008. Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetyllactis* CRL264 by acidic growth. Appl. Environ. Microbiol. **74**:1988-1996.
13. 佐古田久雄, 赤坂直紀, 藤原伸介. 2014. 酢酸菌の新たな利用法. 日本醸造協会誌 **109**:147-153.
14. **Yadav V, Paniliatis BJ, Shi H, Lee K, Cebe P, Kaplan DL.** 2010. Novel *in vivo*-degradable cellulose-chitin copolymer from metabolically engineered *Gluconacetobacter xylinus*. Appl. Environ. Microbiol. **76**:6257-6265.
15. **Adachi O, Ano Y, Toyama H, Matsushita K.** 2006. High shikimate production from quinate with two enzymatic systems of acetic acid bacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. **70**:2579-2582.
16. **Lee S, Flores-Encarnación M, Contreras-Zentella M, Garcia-Flores L, Escamilla JE, Kennedy C.** 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome *c* biogenesis genes. J. Bacteriol. **186**:5384-5391.
17. **Akasaka N, Sakoda H, Hidese R, Ishii Y, Fujiwara S.** 2013. An efficient method using *Gluconacetobacter europaeus* to reduce an unfavorable flavor compound, acetoin, in rice

- vinegar production. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**:7334-7342.
18. **Akasaka N, Ishii Y, Hidese R, Sakoda H, Fujiwara S.** 2014. Enhanced production of branched-chain amino acids by *Gluconacetobacter europaeus* with a specific regional deletion in a leucine responsive regulator. *J. Biosci. Bioeng.* **118**:607-615.
 19. 赤坂直紀, 佐古田久雄, 藤原伸介. 2012. 酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* による分岐鎖アミノ酸の生産. *生物工学会誌* **90**:374-380.
 20. **Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
 21. **Bolívar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.
 22. **Green MR, Sambrook JF.** 2012. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 23. **Andrés-Barrao C, Falquet L, Calderon-Copete SP, Descombes P, Ortega Pérez R, Barja F.** 2011. Genome sequences of the high-acetic acid-resistant bacteria *Gluconacetobacter europaeus* LMG 18890^T and *G. europaeus* LMG 18494 (reference strains), *G. europaeus* 5P3, and *Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2 (isolated from vinegar). *J. Bacteriol.* **193**:2670-2671.
 24. **Kleiber JR, Unelius CR, Lee JC, Suckling DM, Qian MC, Bruck DJ.** 2014. Attractiveness of fermentation and related products to spotted wing drosophila (Diptera: Drosophilidae). *Environ. Entomol.* **43**:439-447.
 25. **Harwood CS, Canale-Parola E.** 1981. Adenosine 5'-triphosphate- yielding pathways of branched-chain amino acid fermentation by a marine spirochete. *J. Bacteriol.* **148**:117-123.
 26. **Cho BK, Barrett CL, Knight EM, Park YS, Palsson BØ.** 2008. Genome-scale

- reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **105**:19462-19467.
27. **Akasaka N, Astuti W, Ishii Y, Hidese R, Sakoda H, Fujiwara S.** 2015. Change in the plasmid copy number in acetic acid bacteria in response to growth phase and acetic acid concentration. J. Biosci. Bioeng. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.11.003.
 28. **Wheeler DA, Hamblen-Coyle MJ, Dushay MS, Hall JC.** 1993. Behavior in light-dark cycles of *Drosophila* mutants that are arrhythmic, blind, or both. J. Biol. Rhythms **8**:67-94.
 29. **Hardin PE.** 2005. The circadian timekeeping system of *Drosophila*. Curr. Biol. **15**:R714-R722.
 30. **Allada R, Chung BY.** 2010. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. Annu. Rev. Physiol. **72**:605-624.
 31. **Birmingham AL, Kovacs E, Lafontaine JP, Avelino N, Borden JH, Andreller IS, Gries G.** 2011. A new trap and lure for *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). J. Econ. Entomol. **104**:1018-1023.
 32. **Ishii Y, Akasaka N, Goda I, Sakoda H, Fujiwara S.** 2015. Effective trapping of fruit flies with cultures of metabolically modified acetic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. in press.

第7章

総括と展望

酢酸菌は、古くから食酢製造に用いられてきたヒトにとって身近な微生物である。近年、酢酸菌の持つユニークな諸性質を利用して、食酢製造にとどまらない酢酸菌の様々な応用法が検討されている(1)。一方、食酢工業生産において広く用いられている酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* はその産業上の重要性にも関わらず、長らく研究対象とされてこなかったため、遺伝学的・生化学的に不明な点が多い。*K. europaeus* は、酢酸菌の中でも極めて強い酢酸耐性を備えており、他の微生物にとっては致命的となる様な高濃度酢酸存在下でも旺盛な生育を示す(2)。これを利用する事で、閉鎖系を用いずとも雑菌汚染の抑止が可能であり、*K. europaeus* のみを優先的に増殖させる事が出来る。この事は、微生物を用いた物質生産を実施する上で極めて有益かつ合理的である。本研究では、*K. europaeus* を、食酢製造のみならず、種々の有用物質生産におけるプラットフォームとする事を目的とした。その達成のため、第一に、遺伝子破壊技術及び潜在型プラスミドを利用した遺伝子改変技術を確立し、*K. europaeus* 代謝改変のための技術基盤を構築した。続いて、それら技術を用いる事で、生理活性を有するアミノ酸高生産株の構築、及びショウジョウバエを強力に誘引する食酢の開発を試みた。

第2章では、動物において種々の生理活性作用を発揮する分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acid, BCAA) を生産する変異株を、薬剤処理によるランダム変異の導入、及びそれに続く α -アミノ酪酸(α -aminobutyric acid, ABA)耐性株の選抜により作出した。得られた ABAr1-56 株は野生株と比較して、著量のバリン及びロイシンを培養液中に蓄積した。本章で得られた知見は、本研究の起点となるものである。

第3章では、ピリミジン生合成系遺伝子群の一つであるオロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(*pyrE*)及びウラシル要求性を、それぞれ選抜マーカー及び選

扱圧とした, *K. europaeus* における遺伝子破壊技術を構築した. 本手法の有効性を検証するため, 食酢における不快醸造香・アセトインの生合成に関与する α -アセト乳酸デカルボキシラーゼ遺伝子(*aldC*)破壊株を構築した. 得られた *aldC* 破壊株のアセトイン生産性は, 野生株と比較して顕著に減少していた.

第 4 章では, 本研究に供試した *K. europaeus* 野生株より複数の潜在型プラスミドを単離し, それらの細胞内におけるコピー数を含めた特徴付けを行うと共に, 潜在型プラスミドを基とした, 大腸菌, *K. europaeus*, 及び他属酢酸菌において複製可能なシャトルプラスミドを構築した. これにより, プラスミドを利用した遺伝子改変技術の基盤構築に成功した.

第 5 章では, 第 2 章で作出した ABAr1-56 株の変異点解析から, 転写因子 leucine responsive regulatory protein (Lrp) をコードする遺伝子(*KeLrp*)に導入されたナンセンス変異が, *K. europaeus* に BCAA 生産能を付与する決定因子であると推測し, 第 3 章で確立した遺伝子破壊技術を用いて, 同様の変異を導入した株を作出した. 得られた遺伝子破壊株は, ABAr1-56 株と同等の BCAA 生産性を示した. このナンセンス変異導入株は, C 末端側に位置するリガンド結合部位を持たない変異型 *KeLrp* を発現するものと推測され, *KeLrp* 破壊株及び ABAr1-56 株は, 外界の栄養状況を伝達するリガンド分子に対して非感受性であると考えられる. 併せて, BCAA 生合成遺伝子群及び排出ポンプ遺伝子の転写量解析から, *KeLrp* がそれらの発現を制御している事が明らかとなった.

第 6 章では, アセトインが, 食酢主成分である酢酸と共にショウジョウバエ誘引作用を発揮する点に着目し, *K. europaeus* のアセトイン生産能を向上させるべく, 第 3 章において確立した遺伝子破壊技術を用いて代謝改変酢酸菌を作出した. アセトイン合成系は BCAA 生合成系と一部の間接代謝産物(ピルビン酸及び α -アセト乳酸)を共有している. これを踏まえ, アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ遺伝子(*ilvC*)を破壊する事で, 分岐鎖アミノ酸生合成経路を遮断し, アセトイン高生産株を構築した.

また、第5章で作出した *Kelrp* 破壊株は、アセトイン前駆体である α -アセト乳酸の合成に関与するアセトヒドロキシ酸シンターゼ遺伝子(*ihvH*)を高発現しており、副産物として著量のアセトインを培養液中に蓄積した。更に *Kelrp* 破壊株は、バリンの分解産物と考えられるイソ酪酸を微量蓄積した。*ihvC* 破壊株、及び *Kelrp* 破壊株の培養液上清を用いてショウジョウバエ捕虫実験を行ったところ、*Kelrp* 破壊株培養液上清が最も強い誘引作用を示した。この強い誘引性は、酢酸、アセトイン、イソ酪酸、及び未同定の代謝産物の相乗効果に起因する事が示唆された。*Kelrp* 破壊株は BCAA 生産菌としてだけでなく、ショウジョウバエ誘引素材の生産菌としても有望である事が示された。

最後に、本研究に関連した、今後の展望及び解決すべき課題のいくつかを以下に記載した。

第2章及び第5章において、*KeLrp C* 末端領域に位置する推定リガンド結合部位を特異的に欠損させる事で、*K. europaeus* に BCAA 生産能を付与出来る事が明らかとなった。しかしながらその生産量は、これまでに構築されている BCAA 生産菌と比較して低く、実際の工業生産のためには、この点を解決する必要がある。本論文では、生産性を向上させるための戦略として、主にフィードバック制御系の破壊について言及した。この手法は、主に細胞個々の生産性を向上させるための手段である。一方、最終的な生産性は、細胞個々の生産能及び用いる菌株の菌体収量(バイオマス)により決定される。上記の通り、酢酸菌は種々の有用物質生産におけるプラットフォームとして期待されているが、一般に酢酸菌は、大腸菌やコリネ型細菌と比較して細胞増殖が活発ではなく、最終菌体収量も低い。この事が、酢酸菌を用いた物質生産において、生産性を低下させる大きな要因の一つとなっている。序論でも述べた様に、酢酸菌は高濃度酢酸の存在下でも生存していくための、種々の酢酸耐性機構を備えている(3-5)。一方で、それら機構の多くは膜酵素を介した呼吸鎖と連動しており、酢酸耐性機構の発現には多大なエネルギーが必要となる(6)。このエネルギー消費が低バイオマスの

一因と考えられている。また、酢酸菌は多くの炭素源を完全に酸化せず、中間代謝物を環境中へ蓄積する。酢酸発酵がその代表例であり、エタノール酸化により生成した酢酸は、通常それ以降資化される事なく細胞外に放置される。同様の現象がグルコース代謝においても見られ、グルコースの多くは膜結合型グルコースデヒドロゲナーゼによりグルコン酸へと酸化され、それ以上資化されない。近年、膜結合型グルコースデヒドロゲナーゼを破壊する事で、中枢代謝(エントナー-ドウドロフ経路及びペントースリン酸経路)に流入するグルコース量を増加させ、酢酸菌バイオマスを顕著に上昇させる事が可能である事が示された(7)。同様の遺伝子破壊を行う事で、バイオマス増加を介した標的物質の生産性向上が見込めるであろう。

第3章において、ウラシル要求性を指標とした遺伝子破壊技術を確立した。外来遺伝子を選抜マーカーとして用いない系であるため、今後の工業利用への応用も期待出来る技術であると考えられるが、本研究において確立した手法では、選抜マーカーである *pyrE* 遺伝子が遺伝子破壊株ゲノム中に残存してしまうため、それ以降の多重遺伝子破壊が出来ない。これを解決する手法として、遺伝子破壊ベクターの染色体への組み込み(integration/pop-in)、及びそれに続く自己染色体内での相同組換え(pop-out)を利用した遺伝子破壊技術が、酵母や超好熱菌等で確立されている(8, 9)。自在な代謝デザインを実現するためには、多重遺伝子破壊技術は必須である。現在、その確立に向けた取り組みが進行中である。

第4章において、潜在型プラスミドを利用した遺伝子改変技術の基盤構築に成功した。構築された2種の組換えプラスミドは、異種酢酸菌においても複製可能である事が確認され、汎用性の高い遺伝学ツールであると考えられる。更に、第4章でも記述した様に、各プラスミドの和合性を利用する事で、同一の株に複数のプラスミドを導入する事も可能であると考えられる。これを達成するためには、選抜マーカーの変更が必要である。また、抗生物質と比較し、より経済的な選択圧として、栄養要求性が挙げられよう(10)。本研究において、2種の栄養要求性株(ウラシル要求性株及び

BCAA 要求性株)が構築された。これら 2 株に、破壊した遺伝子を *in trans* で供給する事で、安定した宿主ベクター系を構築出来るであろう。

第 6 章において、転写因子 *KeLrp* 破壊株の培養液上清が強力なショウジョウバエ誘引性を発揮し、効率的な捕虫器の原料として利用しうる事が示された。同時に、本研究では同定されなかった未知の代謝産物の影響も予見され、更なる誘引能の増強には、それら物質の特定、及び高生産が必要となるであろう。今後、その未知物質の同定が期待される。

引用文献

1. 佐古田久雄, 赤坂直紀, 藤原伸介. 2014. 酢酸菌の新たな利用法. 日本醸造協会誌 **109**:147-153.
2. **Trček J, Jernejc K, Matsushita K.** 2007. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. *Extremophiles* **11**:627-635.
3. **Mullins EA, Francois JA, Kappock TJ.** 2008. A specialized citric acid cycle requiring succinyl-coenzyme A (CoA):acetate CoA-transferase (AarC) confers acetic acid resistance on the acidophile *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* **190**:4933-4940.
4. **Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S.** 2006. Putative ABC transporter responsible for acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:497-505.
5. **Matsushita K, Inoue T, Adachi O, Toyama H.** 2005. *Acetobacter aceti* possesses a proton motive force-dependent efflux system for acetic acid. *J. Bacteriol.* **187**:4346-4352.
6. 松下一信. 2012. 好気呼吸による「発酵」を行う酢酸菌. 生物工学会誌 **90**:340-343.
7. **Krajewski V, Simic P, Mouncey NJ, Bringer S, Sahn H, Bott M.** 2010. Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* for improved growth rate and growth yield on glucose by elimination of gluconate formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:4369-4376.
8. **Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR.** 1987. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* **154**:164-175.
9. **Sato T, Fukui T, Atomi H, Imanaka T.** 2005. Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3889-3899.
10. **Sakoda H, Imanaka T.** 1990. A new way of stabilizing recombinant plasmids. *J. Ferment. Bioeng.* **69**:75-78.

本論文に関する報告

1. 赤坂直紀, 佐古田久雄, 藤原伸介. 2012. 酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* による分岐鎖アミノ酸の生産. 生物工学会誌 **90**:374-380.
2. **Akasaka N, Sakoda H, Hidese R, Ishii Y, Fujiwara S.** 2013. An efficient method using *Gluconacetobacter europaeus* to reduce an unfavorable flavor compound, acetoin, in rice vinegar production. Appl. Environ. Microbiol. **79**:7334-7342.
3. **Akasaka N, Ishii Y, Hidese R, Sakoda H, Fujiwara S.** 2014. Enhanced production of branched-chain amino acids by *Gluconacetobacter europaeus* with a specific regional deletion in a leucine responsive regulator. J. Biosci. Bioeng. **118**:607-615.
4. **Akasaka N, Astuti W, Ishii Y, Hidese R, Sakoda H, Fujiwara S.** 2015. Change in the plasmid copy number in acetic acid bacteria in response to growth phase and acetic acid concentration. J. Biosci. Bioeng. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.11.003.

謝辞

本研究は関西学院大学大学院理工学研究科生命科学科 藤原研究室において遂行されたものであり、その間終始懇篤なるご指導及びご鞭撻を賜りました藤原伸介教授に深甚なる謝意を表します。

更に、本論文を取り纏めるに当たり、有益なご教示を多数賜りました関西学院大学大学院理工学研究科生命科学科 大谷清教授，松田祐介教授，並びに京都大学大学院農学研究科 保川清教授に深く感謝致します。

本研究遂行に当たり、数々の有益なご助言並びにご教示を賜りましたマルカン酢株式会社研究所 佐古田久雄博士に深く感謝致します。

また本研究遂行に際して、数々の有益なご助言並びにご教示を賜りました関西学院大学大学院理工学研究科生命科学科 秀瀬涼太博士に深く感謝致します。

ショウジョウバエの分譲並びにその飼育に付き懇切丁寧なるご指導を賜りました首都大学東京理工学研究科 井出俊和准教授に深く感謝致します。

本研究遂行に当たり、多くのご協力を頂きました関西学院大学大学院理工学研究科生命科学科 石井友理氏に心より感謝致します。

また、本研究にご協力頂きました関西学院大学理工学部生命科学科 合田慈子氏，東久保遥氏，並びに関西学院大学大学院理工学研究科生命科学科 Astuti Wiwik 氏に感謝致します。

西川諒氏，岡田和真氏，三浦歌織氏をはじめとする関西学院大学大学院理工学研究科生命科学科 藤原研究室の諸氏に感謝致します。

最後に、本研究遂行に際して、関西学院大学大学院理工学研究科生命科学科 藤原研究室に派遣研究の機会を与えて頂きましたマルカン酢株式会社 笹田傳左衛門社長に衷心より感謝の意を表します。