

酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* による 分岐鎖アミノ酸の生産

赤坂 直紀¹・佐古田久雄^{1*}・藤原 伸介²

¹マルカン酢株式会社, ²関西学院大学理工学部生命科学科

(2012年4月19日受付 2012年5月18日受理)

Branched-chain amino acid production by an acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus*

Naoki Akasaka¹, Hisao Sakoda^{1*}, and Shinsuke Fujiwara² (*Microbe Research Unit, Marukan Vinegar Co. Ltd., 5-6 Koyo-cho west, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo, Japan 658-0033*¹, *Department of Bioscience, School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University, 2-1 Gakuen, Sanda, Hyogo, Japan 669-1337*²) *Seibutsu-kogaku* **90**: 374–380, 2012.

Comparative genomics suggested that *Gluconacetobacter europaeus* possesses a biosynthetic pathway for the production of branched-chain amino acids (BCAAs) similar to that in the well-studied BCAA-producing bacteria *Corynebacterium glutamicum* and *Serratia marcescens*. To obtain BCAA-producing *Ga. europaeus*, we attempted to design a screening system using *Ga. europaeus* M0119 isolated from rice vinegar. Alpha-amino butyric acid (ABA) is a well-known valine analogue. It inhibits growth by inducing feedback inhibition during BCAA biosynthesis. *Ga. europaeus* M0119 was treated with *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, and ABA resistant (ABAr) mutants were isolated. Almost all the ABAr mutants showed valine and leucine accumulation in the culture medium, whereas the wild-type strain did not. Among the mutants that were resistant to 50 mM ABA, strain ABAr1-56 showed the highest BCAA production. ABAr1-56 showed valine accumulation in the logarithmic phase (111 mg/l) and leucine accumulation in the stationary phase (20 mg/l). Addition of sodium lactate to the medium promoted BCAA production by ABAr1-56. These results suggest that *Ga. europaeus* is applicable as a BCAA producing bacterium.

[**Key words**: acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter europaeus*, branched-chain amino acid, valine, alpha-amino butyric acid]

アミノ酸発酵は日本が世界に先駆けてその生産技術を確立した、微生物による物質生産の代表例であろう。*Corynebacterium glutamicum*や*Serratia marcescens*などのアミノ酸生産機構が古くから詳細に研究されており^{1,2)}、これまでに、多くの生化学、遺伝学、分子生物学的知見が蓄積している。

分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acid, BCAA, バリン, イソロイシンおよびロイシン) 生産に関しても多数の報告がなされており、さまざまな微生物の代謝経路が研究・利用されている^{1,3)}。一般に、バリン, イソ

ロイシンおよびロイシンは、それぞれピルビン酸, スレオニン, およびバリン生合成系中間代謝産物である2-オキソイソ吉草酸を直接の前駆体とする。バリンおよびイソロイシン合成における4反応は共通の酵素により触媒される。すなわち、アセトヒドロキシ酸シンターゼ (aceto-hydroxyacid synthase, AHAS), アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ (aceto-hydroxyacid isomero-reductase, AHAI), ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (di-hydroxyacid dehydratase, DHAD), およびBCAAアミノトランスフェラーゼ (aminotransferase, AT) である。BCAA

*連絡先 E-mail: sakota@marukan.com

生合成経路における炭素フローは多くの微生物種において共通であるが、その生産調節機構（過剰生産を抑制するための律速酵素に対する制御機構）にはいくつかのパターンが存在する。たとえば大腸菌は、BCAA生合成における共通の律速酵素であるAHASについて、アイソザイムを3種（I～III型）保持しており、各々が最終産物により異なるフィードバック制御を受ける¹⁾。3種のアイソザイムはすべて触媒サブユニットおよびフィードバック制御に必要な調節サブユニットから成る。アイソザイムI (*ilvBN*がコード)の酵素活性はバリンによりフィードバック阻害を受け、さらにその発現はバリンおよびロイシンによりフィードバック抑制（転写減衰）を受ける^{1,4)}。一方アイソザイムII (*ilvGM*がコード)は、最終産物に対して非感受性であり、フィードバック阻害は生じないが、3種のBCAAによりフィードバック抑制を受ける^{1,4)}。また、アイソザイムIII (*ilvIH*がコード)はバリンおよびロイシンによって、その酵素活性および遺伝子発現がそれぞれフィードバック阻害およびフィードバック抑制されることが知られている^{1,4)}。さらに、ロイシンは転写因子である *Leucine responsive regulatory protein* (Lrp)^{5,6)}と相互作用することで、BCAA生合成系遺伝子群を含めた、多数の下流遺伝子の発現を調節することが明らかにされている。このように微生物におけるBCAA生産調節機構には複数のタイプが存在するため、対象とする微生物に同アミノ酸を産生させる際には、調節機構を把握し、その上でそれら調節機構の欠損株を選抜することが有効な手段の一つである¹⁾。たとえば、上記目的のために古くから用いられてきた手法として、薬剤によるランダム変異の導入、および代謝拮抗剤であるアミノ酸アナログに対する耐性を指標としたスクリーニングがよく知られている¹⁾。バリンアナログである α -アミノ酪酸 (α -amino butyric acid, ABA)に耐性を有する *S. marcescens* は培地中に著量のバリンを蓄積するが³⁾、この変異株では、律速酵素が代謝拮抗剤および最終産物に非感受性となることで、その活性がフィードバック制御より脱抑制されており、結果として目的とするアミノ酸が著量生産される。

酢酸菌は、古来、世界各地で食酢醸造に用いられてきた身近な微生物であり、これらにより生産される食酢の機能性も科学的に解明されている⁷⁾。また、酢酸菌を食酢生産以外へ応用する試みも行われており、酢酸菌の新たな可能性が模索されている⁸⁾。さらに近年、高速シーケンス技術が著しく進歩し、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析がさまざまな生物種で行われ、食酢醸造に関与するいくつかの酢酸菌においても、すでにゲノム配列が決定され、種々の代謝経路に関するデータも蓄積し

つつある^{9,10,11)}。そこでこれらの背景および知見を踏まえ、食酢発酵液より単離した酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* におけるBCAA生合成経路およびその生産調節機構を推測して、その上でBCAAアナログに対する耐性を付与することで、BCAAを生産する酢酸菌の作出を試みた。

実験方法

供試株 親株として、食酢発酵液より単離した *Ga. europaeus* M0119株を供試した。

培地組成および培養条件 完全培地としてYPD培地（酵母エキス5 g/l, ポリペプトン2 g/l, グルコース30 g/l）を用いた。YPD培地は前々培養および前培養に用いた。アナログ感受性試験、アナログ耐性株のスクリーニングおよび分岐鎖アミノ酸（BCAA）生産性試験には、最少培地（グルコース30 g/l, L-グルタミン酸ナトリウム・一水和物4 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, 塩化鉄（III）0.005 g/l, 硫酸亜鉛・七水和物0.05 g/l, モリブデン（IV）酸二ナトリウム・二水和物0.0005 g/l, ホウ酸0.0005 g/l, 硫酸銅・五水和物0.0025 g/l, 硫酸マンガン・五水和物0.01 g/l, 塩化コバルト（II）0.0005 g/l, (+)-パントテン酸カルシウム0.002 g/l）を用いた。必要に応じ、これら培地に0.5% (v/v) エタノールおよび酢酸（以下「E0.5/A0.5」と記載）、寒天9 g/lを添加して培養に用いた。培養はすべて30°Cで行い、液体培養の際は往復振とう150 rpmで培養を行った。

α -アミノ酪酸（ABA）感受性試験 BCAAアナログとして、DL- α -アミノ酪酸（ABA, シグマアルドリッチ社）を用いた。前々培養として、酢酸菌のグリセロールストック100 μ lを5 ml YPD E0.5/A0.5に接種し、30°Cで15時間培養した。前々培養液1 mlを50 ml YPD E0.5/A0.5に継代し、さらに24時間培養して前培養とした。前培養液を4°C, 10,000 rpmで5分間遠心し、菌体を回収した。菌体を生理食塩水（塩化ナトリウム8.5 g/l）に再懸濁し、洗浄した。この洗浄作業を2回行い、最終の接種菌体とした。この菌体を、ABAを含む30 ml最少培地E0.5/A0.5に、OD₆₆₀=0.03となる様接種し培養を行った。経時的に少量の培養液を採取し、濁度を測定した。コントロールの生育が定常期初期に到達した時点のOD₆₆₀を100%とし、同培養時間におけるABAの生育阻害効果およびBCAAの生育回復効果を、増殖比（relative growth）として表記した。なお、ABA感受性試験で用いた最少培地は、窒素源として、グルタミン酸ナトリウムの代わりに硫酸アンモニウム1 g/lを含む。

突然変異処理 突然変異処理およびアナログ耐性株のスクリーニングは、既報^{3,12)}に従った。N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG, 和光純薬) による変異処理後、菌体を2 ml YPD E0.5/A0.5に接種して約40時間振とう培養した。その後、菌体を回収・洗浄し、50 mM ABAを含む最少寒天培地に塗布して(10⁸~10⁹ cells/plate), 30°Cで7~10日間培養した。生じたコロニーをABA耐性株 (ABA resistant, ABAr株) として単離し、以降の生産性試験へ供試した。

BCAA生産性試験 上記ABA感受性試験と同様の手法で前々培養および前培養を行い、得られた菌体を20 ml最少培地E0.5/A0.5にOD660=0.03となるよう接種し、96時間振とう培養した。少量の培養液を経時的に採取し、その遠心上清10 µlを薄層クロマトグラフにより展開し、アミノ酸を検出した¹³⁾。また、同培養液上清中のBCAA蓄積量は、L-8800形高速アミノ酸分析計(日立ハイテクノロジー)を用いて定量した(ニンヒドリン試薬を用いた定量)。

実験結果

Ga. europaeus M0119株の分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 合成経路予測 BCAA生産菌の作出に先立ち、M0119株と同種のタイプ株である *Ga. europaeus* LMG18890¹¹⁾ のドラフトゲノムデータに対し、完全ゲノム配列が公開されている近縁種酢酸菌 *Ga. xylinus* NBRC3288¹⁰⁾ の、BCAA生合成系遺伝子群とアノテーションされている配列 (アミノ酸) をクエリとして相同性検索 (tblastn)

を行い、*Ga. europaeus* LMG18890¹¹⁾におけるBCAA生合成経路を推測した。その結果、LMG18890株ゲノム中において、各クエリに対応するアミノ酸配列が存在した。これらアミノ酸配列は、*Ga. xylinus* NBRC3288のアミノトランスフェラーゼ (AT) と89%、その他はすべて90%以上と非常に高い同一性を示した (Table 1)。これらの結果から、*Ga. europaeus*も *S. marcescens*³⁾や *C. glutamicum*¹⁾と類似のBCAA生合成系を持つものと推測された (Fig. 1)。その中でも、律速酵素と考えられるAHASは、触媒サブユニットおよび調節サブユニットともに、大腸菌K-12株の *ilvI* (GenBank accession No.: AAC73188.2) および *ilvH* (同AAC73189.1) のコード

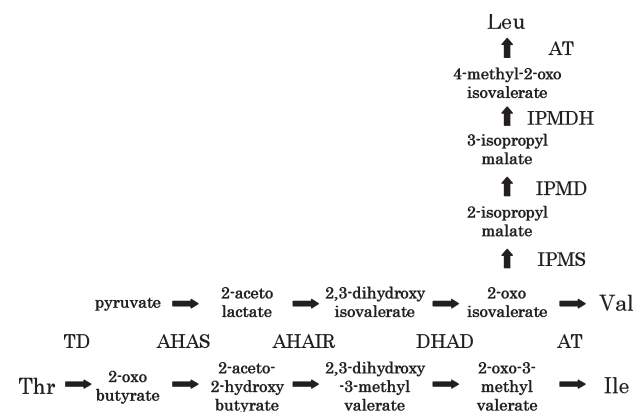


Fig. 1. Predicted biosynthetic pathway of branched-chain amino acid (BCAA), based on draft genome sequences of *Ga. europaeus* LMG18890¹¹⁾. See Table 1 for abbreviations of enzymes.

Table 1. Homology search analysis of *Ga. europaeus* LMG18890 genome.

| Encoded enzyme(*) | GenBank accession No. of query protein sequence | Homology of subjects | |
|-------------------|---|----------------------|------------------|
| | | Coverage | Identity |
| TD | BAK83415 | 100% | 387/398 aa (97%) |
| AHAS (L) | BAK84097 | 96% | 574/602 aa (95%) |
| AHAS (S) | BAK84096 | 100% | 181/186 aa (97%) |
| AHAIR | BAK84095 | 100% | 333/339 aa (98%) |
| DHAD | BAK84527 | 100% | 585/620 aa (94%) |
| AT | BAK84419 | 100% | 322/363 aa (89%) |
| IPMS | BAK84840 | 99% | 503/523 aa (96%) |
| IPMD (L) | BAK83331 | 100% | 454/467 aa (97%) |
| IPMD (S) | BAK83330 | 100% | 195/207 aa (94%) |
| IPMDH | BAK83329 | 100% | 363/376 aa (97%) |

Protein sequences of *Ga. xylinus* NBRC3288 BCAA biosynthetic enzymes were used as queries for the blast search (tblastn). GenBank accession number: the complete genome sequence of *Ga. xylinus* NBRC3288, AP012159; draft genome sequences of *Ga. europaeus* LMG18890, CADP010000001 - 000321. (*) TD, threonine deaminase; AHAS, acetohydroxyacid synthase; AHAIR, acetohydroxyacid isomeroreductase; DHAD, dihydroxyacid dehydratase; AT, aminotransferase; IPMS, 2-isopropylmalate synthase; IPMD, 3-isopropylmalate dehydratase; IPMDH, 3-isopropylmalate dehydrogenase. (L) and (S) mean large and small subunit, respectively.

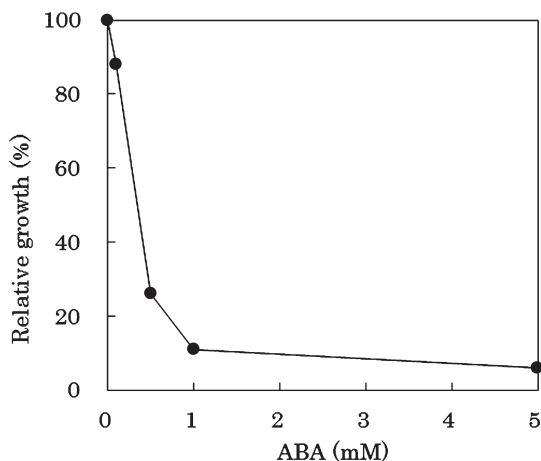


Fig. 2. Growth inhibition by alpha-amino butyric acid (ABA). M0119 was cultivated in the minimal medium containing various concentration of ABA. Experiments were conducted in triplicate and mean values were shown.

するタンパク質と、アミノ酸配列においてそれぞれ50%および47%の同一性を示した (data not shown). 緒論でも記述したように、*ilvIH*にコードされるアイソザイムIIIはバリンおよびロイシンによりフィードバック制御を受けることが知られており、上記の相同性検索結果から、*Ga. xylinus*および*Ga. europaeus*においては、アイソザイムIIIと同様の制御機構が存在する可能性が示唆された。一方、アイソザイムIおよびIIに相当すると考えられる酵素遺伝子の塩基配列は、両菌株のゲノムにおいて確認できなかった。

M0119株の α -アミノ酪酸 (ABA) 感受性 BCAAのアナログであるABA、ノルバリンやノルロイシンは、実際の最終産物によるフィードバック制御を疑似的に引き起こし、当該アミノ酸の生合成を阻害することで微生物の増殖を抑制・阻害することが知られている¹⁾。前述の代謝経路予測結果を踏まえると、フィードバック制御から脱抑制された変異株を作出するには、バリンまたはロイシンのアナログの利用が有効であると考えられたため、M0119株のABA (バリンアナログ) に対する感受性を解析した。最少培地にABAを添加してM0119株を培養すると、その生育はABA濃度の上昇と共に阻害され、5 mMではほぼ完全に増殖は停止した (Fig. 2)。また、ABAに加え1 mMのバリン、ロイシン、またはイソロイシンそれぞれを単独で添加すると、ABAによる生育阻害効果は部分的に解消された (Fig. 3)。その中でもロイシンの回復効果が高くと高く、増殖はコントロールの約80%にまで回復した (ABAのみの時、23%)。さらに、3種すべてのBCAAを添加すると、生育阻害はほぼ完全に解消された (Fig. 3)。

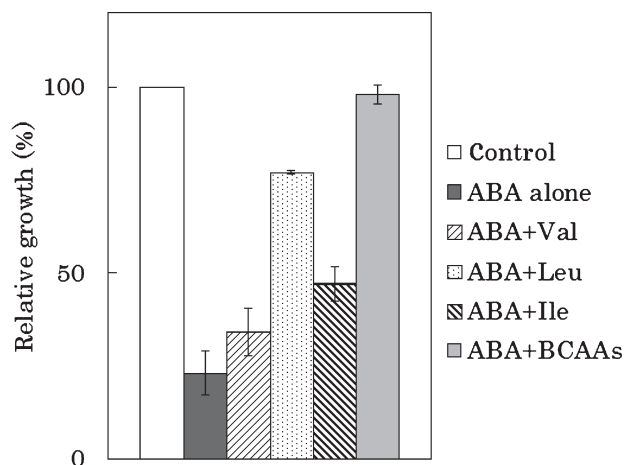


Fig. 3. Antagonistic effects of BCAAs against ABA growth inhibition. The inhibitory effect of ABA was antagonized by addition of BCAAs. All media contained 1 mM ABA, except for control. Control, neither BCAA nor ABA was not supplemented. ; ABA alone, 1 mM ABA; ABA + Val, 1 mM ABA and 1 mM Val; ABA + Leu, 1 mM ABA and 1 mM Leu; ABA + Ile, 1 mM ABA and 1 mM Ile; ABA + BCAAs, 1 mM ABA and 1 mM all BCAAs. Experiments were conducted in triplicate and error bar indicates standard deviation.

ABA耐性株の作出 M0119株のABA感受性を踏まえ、BCAAの生産調節機構欠損株を作出するため、実験方法に示した手法でABA耐性を有する変異株のスクリーニングを行った。その結果、50 mM ABAを含む最少培地プレート上で生育するコロニーが多数得られ、これらを耐性株とした。得られたABA耐性株 (ABAr株) 約150株を2 ml最少培地に接種し、4日間振とう培養してBCAA蓄積量を薄層クロマトグラフにより検出したところ、その多くが微量のバリンおよびロイシンを蓄積した。その中でもっとも生産性が高いと判断されたABAr1-56株を以降の実験に供試した。

ABAr1-56株のABA耐性 ABAr1-56株を、ABAを含む最少培地で培養したところ、5 mMまたは10 mMのABA存在下でも正常に増殖した (Fig. 4)。この結果から、ABAr1-56株が高濃度のABAに対する耐性を有することが確認された。

ABAr1-56株のBCAA生産性と最適基質の探索 ABAr1-56株のBCAA生産能を経時的に解析した。生育特性を親株 (M0119株) と比較したところ、ほとんど差異が見られなかった (Fig. 5)。BCAA生産能を薄層クロマトグラフにて分析した結果、ABAr1-56株は培養24~48時間 (対数増殖中期~定常期) にかけてバリンを蓄積した (Fig. 6)。さらに、培養96時間で微量のロイシンも蓄積した (Fig. 6)。同様の培養液上清をアミノ酸自動分析に供試してBCAAを定量したところ、バリン

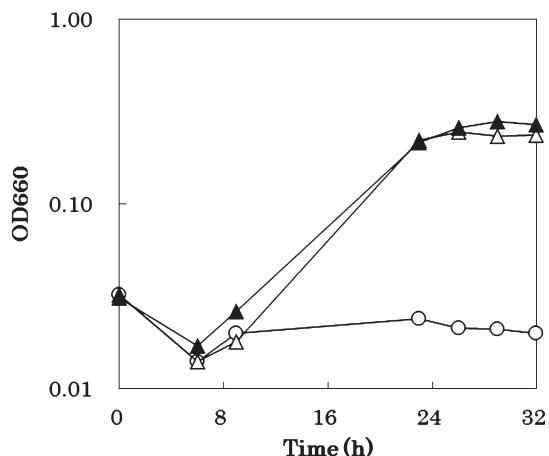


Fig. 4. ABA resistance of ABAr1-56. Symbols: ○, M0119 + 5 mM ABA; △, ABAr1-56 + 5 mM ABA; ▲, ABAr1-56 + 10 mM ABA. Experiments were conducted in triplicate and mean values were shown.

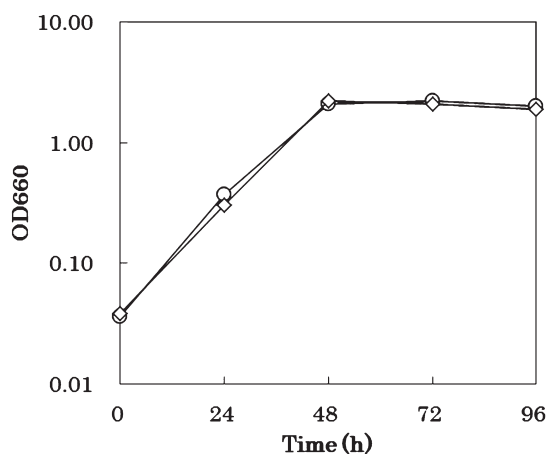


Fig. 5. Growth of M0119 and ABAr1-56 in the minimal medium. Symbols: ○, ABAr1-56; ◇, M0119. Experiments were conducted in triplicate and mean values were shown.

およびロイシン蓄積量は、それぞれ 111 mg/l (約 1 mM) および 20 mg/l (約 0.15 mM) であった (Table 2).

続いて、BCAA生産における最適基質の探索を行った。バリンおよびロイシン生合成における初発基質はピルビン酸であるため、遊離ピルビン酸量を上昇させる様な基質は、BCAA生産において有効であると考えられた。そこで、このような効果を発揮しうる種々の炭素源を最少培地へ添加して培養を行ったところ、乳酸ナトリウム 10 g/lの添加で、バリン蓄積量は非添加時の約1.5倍にまで上昇した (Fig. 7)。ロイシンについてもわずかな増加が見受けられたが (非添加時の約1.3倍)、その効

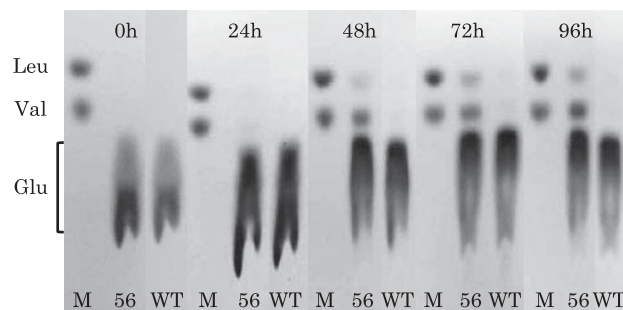


Fig. 6. BCAAs production by ABAr1-56. BCAAs were detected by thin layer chromatography (TLC). 10 μ l of 1 mM Val (lower spot) and 1 mM Leu (upper spot) were spread as markers (M). Lane: 56, ABAr1-56; WT, M0119.

Table 2. Quantity of BCAA produced by ABAr1-56.

| Strain | Branched-chain amino acids (mg/l)* | | |
|-----------|------------------------------------|-----|-----|
| | Val | Leu | Ile |
| ABAr 1-56 | 111 | 20 | ND |
| M0119 | ND | ND | ND |

* Quantity of BCAAs in 96 hr culture of ABAr1-56 and M0119 measured by amino acid auto analyzer. Detection limit of the analyzer was 10 mg/l.

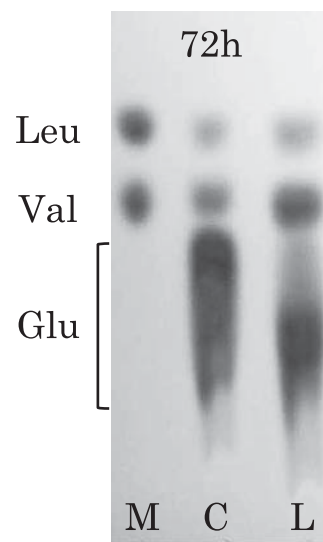


Fig. 7. BCAAs produced by ABAr1-56 cultivated for 72 hours in the minimal medium containing 10 g/l of sodium lactate. Lane: M, marker; C, control; L, sodium lactate 10 g/l.

果はバリンほど大きくなかった (Fig. 7)。一方、ピルビン酸ナトリウム 10 g/lの添加でもバリン蓄積量の増加が見られたが、生産性に対する効果は乳酸ナトリウムより

も小さかった (data not shown). さらに、グルコース (50 ~ 100 g/l), グリセロール (30 g/l) または酢酸 (1 ~ 2%, v/v) を添加して培養を行ったが, BCAA 蓄積量に影響は見られなかった (data not shown).

考 察

代謝調節機能を欠損した微生物によるアミノ酸発酵は既に確立された技術であり, *C. glutamicum* によるグルタミン酸発酵²⁾はその中でもよく知られた例の一つであろう. 分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 生産に関してもすでに多くの知見が蓄積しており, 既報によれば, 本報告と同様の手法により得られたアミノ酸アナログに耐性を有する *S. marcescens*^{1,3)} や *C. glutamicum*^{1,14)} は, 数十~数百 mM ものバリンを蓄積する. また近年, ゲノム解析を含めた網羅的解析技術の進歩に伴い, アミノ酸生産に必要な変異を *in silico* でシミュレーションし, 代謝全体を再編・デザインすることで生産菌を育種する試みも行われている^{15,16)}. 今回, 酢酸菌 *Ga. europaeus* LMG18890¹¹⁾ のドラフトゲノム情報から同酢酸菌における BCAA 生合成経路を予測し, 得られた情報をもとにフィードバック制御から脱抑制された変異株の作出を試みた. その結果, バリンアナログである α -アミノ酪酸 (ABA) に対する耐性を付与することで, バリン (111 mg/l) およびロイシン (20 mg/l) を産生させることに成功した. タイプ株のゲノム情報および ABA に対する挙動 (Fig. 2・Fig. 3) から, M0119 株の BCAA 生合成系はバリンによりフィードバック制御が誘導され, 特にそのターゲットは, BCAA 生合成における共通の律速酵素アセトヒドロキシ酸シンターゼ (AHAS) (Fig. 1) である可能性が高い. 実際に, 高濃度のバリンを添加した培養系では M0119 株の生育は著しく阻害されるため (data not shown), この現象からも, Kisumi らの報告³⁾ と類似のバリンによるフィードバック制御機構の存在が示唆される. 一方, ロイシンによる高い生育回復効果 (Fig. 2) が見られたが, この現象は Kisumi らの報告³⁾ とは若干異なることから, 既知の機構に加え, 酢酸菌固有の制御機構も存在するのかもしれない.

また, BCAA 生産を促す最適基質の探索を行ったところ, 乳酸ナトリウムの添加でバリン蓄積量の顕著な上昇が見られた (非添加時の約 1.5 倍) (Fig. 7). 一般にバリンおよびロイシン生合成における初発基質はピルビン酸であり, 乳酸は乳酸デヒドロゲナーゼ (lactate dehydrogenase, LDH) の作用によりピルビン酸へ転換される¹⁷⁾. 今回のゲノム解析結果から, *Ga. europaeus* LMG18890¹¹⁾ ゲノム中にも LDH 遺伝子と考えられる配列が存在しており, 添加した乳酸がピルビン酸へ転換さ

れ, さらに BCAA へと転換されたものと考えられる.

一般に, ロイシン生合成はバリンとは異なり二段階で制御されており, 第一律速酵素が AHAS, 第二律速酵素が 2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (2-isopropylmalate synthase, IPMS) である¹⁾ (Fig. 1). IPMS はロイシンによるフィードバック阻害を受けることが知られている. 本研究では IPMS の脱抑制については考慮しておらず, ABAr1-56 株のロイシン蓄積量がバリンに比べ少なかったのは (Table 2), このようなロイシンのフィードバック制御に起因すると考えられる. また, ABAr1-56 株はイソロイシンを蓄積しなかった (Table 2). イソロイシン生合成もロイシン同様に多段階で制御されており, 第一および第二律速酵素が, それぞれスレオニンデアミナーゼ (threonine deaminase, TD) および AHAS である¹⁾ (Fig. 1). TD はイソロイシンによる強いフィードバック阻害を受けることが知られており, ABAr1-56 株においても, 第一律速酵素に対するフィードバック阻害が機能したため, イソロイシン蓄積が抑制された可能性も考えられる. さらに, 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 TCA サイクルへ流入した後, オキサロ酢酸およびアスパラギン酸を経由する長い反応経路を経て供給されるため¹⁷⁾, その過程における炭素流亡の影響が, バリンやロイシン生産と比較して大きいと考えられる. これら課題を解決すれば, 酢酸菌によるロイシンやイソロイシン生産も期待される.

今回得られた ABA 耐性株 (ABAr 株) ゲノム中には, NTG により多数の変異が導入されているものと考えられ, アナログ/アミノ酸の排出・分泌系や転写因子などの発現調節機構など, 律速酵素遺伝子以外の変異も考えうるであろう. アミノ酸分泌に着目すると, 既報¹⁸⁾によれば, 多くのグラム陰性菌がバイオフィーム中に微量のバリンを分泌することが明らかにされており, 古くから知られる「バリン耐性」という形質との関連性が示唆されている. 酢酸菌の場合, 主に食酢の静置発酵に用いられる *Acetobacter pasteurianus* は気液面にセルロースを主体としたバイオフィームを形成する. 今回供試した M0119 株はそのようなバイオフィームは形成しないが, 上記の知見を踏まえると, 酢酸菌を含めた多くの細菌が, バリン生産菌としての潜在的可能性を持つと期待される.

本研究では, 比較ゲノム解析に, タイプ株である *Ga. europaeus* LMG18890¹¹⁾ のドラフトゲノムデータを用いたが, タイプ株の BCAA 生合成系に関しては詳細な解析は行われていない. これらを解明するため, 現在筆者らは M0119 株および BCAA 生産菌について, より詳細な分子生物学的解析を進めている.

要 約

比較ゲノム解析から *Gluconacetobacter europaeus* には分岐鎖アミノ酸 (BCAA, バリン, イソロイシンおよびロイシン) の生合成経路が存在し, 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. 本研究ではバリンのアナログである α -アミノ酪酸 (ABA) の耐性株を作出することで, 本菌のBCAA蓄積の可能性を検証した. 食酢発酵液より単離された *Ga. europaeus* M0119株をNTGで処理し, ABA耐性株 (ABAr株) を得た. これらの多くはBCAAを培地中へ蓄積した. 分離されたABAr株のうち, もっともBCAA生産能の高かったABAr1-56株に注目し, 生育段階におけるBCAAの生産性を検討した. ABAr1-56株は対数増殖期から効率的にバリンを蓄積し (111 mg/l), 定常期にはロイシンも蓄積した (20 mg/l). バリンおよびロイシンの初発基質はピルビン酸であり, 遊離ピルビン酸量の上昇が期待される種々の炭素源を添加して培養を行ったところ, 乳酸ナトリウムの添加でバリン蓄積量の顕著な上昇が見られた (非添加時の約1.5倍). 今回得られた知見は, 酢酸菌 *Ga. europaeus* がBCAAの生産菌として利用できる可能性を示唆する.

文 献

- 1) 相田 浩, 滝波弘一, 千畑一郎, 中山 清, 山田秀明: アミノ酸発酵, 学会出版センター, 東京 (1986).
- 2) Sano, C.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **90**, 728S–732S (2009).
- 3) Kisumi, M., Komatsubara, S., and Chibata, I.: *J. Bacteriol.*, **106**, 493–499 (1971).

- 4) Platko, J. V., Willins, D. A., and Calvo, J. M.: *J. Bacteriol.*, **172**, 4563–4570 (1990).
- 5) Cho, B. K., Barrett, C. L., Knight, E. M., Park, Y. S., and Palsson, B. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 19462–19467 (2008).
- 6) Jafri, S., Chen, S., and Calvo, J. M.: *J. Bacteriol.*, **184**, 5293–5300 (2002).
- 7) 榊原章二, 岸 幹也, 加賀孝之: バイオサイエンスとインダストリー, **65**, 357–359 (2007).
- 8) 薬師寿治, 松下一信: バイオサイエンスとインダストリー, **67**, 308–315 (2009).
- 9) Azuma, Y., Hosoyama, A., Matsutani, M., Furuya, N., Horikawa, H., Harada, T., Hirakawa, H., Kuhara, S., Matsushita, K., Fujita, N., and Shirai, M.: *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5768–5783 (2009).
- 10) Ogino, H., Azuma, Y., Hosoyama, A., Nakazawa, H., Matsutani, M., Hasegawa, A., Otsuyama, K., Matsushita, K., Fujita, N., and Shirai, M.: *J. Bacteriol.*, **193**, 6997–6998 (2011).
- 11) Andrés-Barrao C., Falquet, L., Calderon-Copete, S. P., Descombes, P., Ortega Pérez, R., and Barja, F.: *J. Bacteriol.*, **193**, 2670–2671 (2011).
- 12) Ohmori, S., Uozumi, T., and Beppu, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 381–389 (1982).
- 13) 日本生物工学会編: 生物工学実験書 改訂版, p.37–39, 培風館 (2002).
- 14) Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Kubota, K., and Momose, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1319–1322 (1975).
- 15) Park, J. H., Lee, K. H., Kim, T. Y., and Lee, S. Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**, 7797–7802 (2007).
- 16) Ikeda, M., Mitsuhashi, S., Tanaka, K., and Hayashi, M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 1635–1641 (2009).
- 17) 日本生化学会編: 細胞機能と代謝マップ I. 細胞の代謝・物質の動態, p.194, 東京化学同人 (1997).
- 18) Valle, J., Da Re, S., Schmid, S., Skurnik, D., D’Ari, R., and Ghigo, J. M.: *J. Bacteriol.*, **190**, 264–274 (2008).