総 説

酢酸菌の酢酸耐性機構について

惠美須屋 廣昭

株式会社 Mizkan Holdings 中央研究所

味噌、醤油、漬物や酒造りなどの発酵食品の製造において、乳酸菌は乳酸を生産して pH を下げて、他の微生物の繁殖を抑制するという重要な働きを行っている。また、酢酸菌を用いて生産する食酢に抗菌活性があることはよく知られている。環境中の pH を下げることで雑菌汚染を防ぐという抗菌作用は乳酸と酢酸に共通するものであるが、酢酸は細胞内に浸透するという特性があり、それゆえに乳酸に比べてより高い抗菌活性を有している。酢酸菌が生産する酢酸は、酢酸菌自らにとってもストレスになるのだが、酢酸菌は高濃度の酢酸共存下でも生育が可能であり、酢酸菌に特有の耐性機構が幾つか明らかになってきている。すなわち、①酢酸を細胞内へ流入しにくくする、②細胞内の酢酸を効率よく消費する、③細胞内の酢酸を細胞外に排出する、④細胞内の環境変化への対応機構をもっている、である。これらの現在確認されている酢酸菌の持つ酢酸耐性機構について概説する。

Key words : AarA, AarC, aconitase, ABC-transporter, acetic acid tolerance

1. はじめに

古くから調味料のひとつとして慣れ親しまれている食酢は、高めの血圧を下げる、高めの血中総コレステロールを下げる、肥満気味の人の内臓脂肪を減らす、食後の血糖上昇を穏やかにする、疲労回復を助けるなど、多くの健康機能を有している¹⁻⁴⁾。また、その主成分である酢酸が広く抗菌活性をもっていることはよく知られており、腸管出血性大腸菌 O-157 をはじめ、黄色ブドウ球菌、サルモネラなどの食中毒菌は、わずか 0.1% の酢酸濃度で生育が抑制される⁵⁾。

食酢の主成分である酢酸は、酢酸菌の細胞膜に局在するアルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、呼吸鎖末端酸化酵素の一連の酵素群により、エタノールが酸化されて生産され、酢酸菌の中でもエタノール酸化能の強い *Acetobacter* と *Gluconacetobacter* が食酢の生産に用いられている。工業的な食酢生産は、桶や壺を用いて液表面に酢酸菌膜を形成して発酵させる「表面発酵」と、攪拌翼の

ついた発酵タンクで通気攪拌しながら発酵させる「深部通気発酵」の 2 通りが主流となっている。表面発酵では酸度 4 ~ 6%、深部通気発酵においては 5 ~ 20% の酸度の食酢発酵が行われている。*Acetobacter* が 10% 程度の酢酸発酵が可能であるのに対し、*Gluconacetobacter* は 10% を超える高い酢酸酸度の発酵が可能である。自らが生産する酢酸は、酢酸菌にとってもストレスになるのだが、酢酸菌は高濃度の酢酸共存下でも生育が可能であり、その酢酸耐性機構は非常に興味深い。

酢酸が乳酸と比較して特徴的であるのは、乳酸の酸解離定数 (pKa) が 3.8 であるのに対して、酢酸の pKa は 4.8 であり、弱酸性の環境で酢酸のほとんどが非解離型として存在する。非解離型の酢酸は細胞のリン脂質二重層を濃度依存的に通過することができ、細胞内に入ってプロトンを放出して細胞内の pH を下げる⁶⁾。さらにその際に、膜を介した電子伝達系で生成した膜電位を打ち消してしまう。したがって、酢酸は細胞内に流入することにより高い抗菌活性を有している (Fig. 1)。酢酸の細菌に対する抗菌作用、つまり細胞内に容易に流入するという特性に対して、酢酸菌特有の耐性機構が幾つか明らかになってきた。以下に解明されてきた酢酸菌に特有の酢酸耐性機構を紹介する。

*To whom correspondence should be addressed.
Phone : +81-569-24-5033
Fax : +81-569-24-5028
E-mail : hiroaki_ebisuya @ mizkan.co.jp

＜酢酸の抗菌活性＞

- (1)細胞内の pH 低下
- (2)膜電位 (ΔH^+) の低下

＜酢酸菌の酢酸耐性メカニズム＞

1. 非解離型酢酸の細胞内への浸入を防ぐ
2. 細胞内に入ってきた酢酸を消費する
3. 細胞内に入ってきた酢酸を排出する
4. 細胞内の pH 低下に対する安定化

Fig. 1. 酢酸菌のエネルギー獲得モデルと酢酸の抗菌活性メカニズム、及び酢酸菌の酢酸耐性メカニズム

酢酸菌はエタノールをペリプラズム層に局在する ADH と ALDH によって酢酸まで酸化し、その際に細胞膜を介して発生する膜電位によって ATP を合成する。非解離型の酢酸は細胞膜のリン脂質二層を濃度に依存して浸透し、細胞内でプロトンを放出することで高い抗菌活性を有する。酢酸菌は酢酸の浸透性と浸透する酢酸に対して複数の耐性メカニズムを有している。

2. 酢酸菌の酢酸耐性機構

2-1. 酢酸を細胞内へ流入しにくくする

酢酸菌における酢酸耐性機構として、まず細胞内への酢酸の流入を抑制する機構が示唆されている。高酸度食酢発酵菌である *Gluconacetobacter* の細胞膜脂質は特徴的な構成を持つ。すなわち、ホパノイド、特にテトラヒドロキシバクテリオホパン (tetrahydroxy-bacteriohopane: THBH) が高い含量で存在している (Fig. 2)⁷⁾。ホパノイドは他の微生物にあまり高い割合で含まれておらず、テキーラの発酵を行う *Zymomonas mobilis* の細胞膜に THBH が例外的に含まれている⁸⁾。また、*Z. mobilis* 細胞において、アルコール発酵中に膜脂質中の THBH 含量が増加することが知られており、高濃度のアルコール存在下で *Z. mobilis* 細胞の安定化に関与していると考えられている⁹⁾。酢酸菌の膜脂質においてはその 25% と高い割合で THBH が含まれており、酢酸菌の酢酸耐性へ関与する可能性が考えられた。*Acetobacter aceti* を用いて THBH の前駆体の合成酵素であるスクワレン-ホパンサイクラーゼ (HpnF) の高発現株を作製し野生株との比較を行ったところ、スクワレン-ホパンサイクラーゼ遺伝子 (*hpnF*) をベクタープラスミド pMV24 を用いて形質転換した HpnF 高発現株は、その膜脂質中の THBH 含量が野生株よりも高い比率を示した。そして、酢酸に対しては HpnF 高発現株がより高い耐性を示すことが確認された⁷⁾。なお、この HpnF 高発現株ではアルコールに対する耐性に顕著な差は見られなかったが、その理由はまだ不明である。

また、酢酸菌は静置で培養すると液体培地表面に浮いて菌膜を形成する能力を持っている。これは菌体表面に不溶性多糖を作るためと考えられており、寒天固体培地においては表面がざらついたコロニーを形成する¹⁰⁾。この菌体表面多糖も酢酸耐性に関与していると考えられる。実際に *Acetobacter pasteurianus* の菌体表面多糖合成能の欠損株と親株との比較において、親株の細胞内の酢酸含量が欠損株よりも有意に低いことが確認されており、酢酸菌が合成する菌体表面多糖が細胞内への酢酸の浸入を抑制していると示唆されている¹¹⁾。

このように、酢酸菌は細胞質膜の脂質構成成分の最適化を図り、さらに菌体の外周に多糖を形成することにより、酢酸の細胞内流入を低減させるという耐性メカニズムを有していると考えられる。

2-2. 細胞内の酢酸を効率よく消費する

細胞内に浸入してくる酢酸に対して、それを除去するメカニズムも知られている。一つの除去方法は、細胞内酢酸を分解消費するメカニズムである。*A. aceti* の酢酸感受性株を用いた遺伝学的アプローチによって、*aarA*、*aarB*、*aarC* からなる酢酸耐性遺伝子クラスターが同定されている。それらの遺伝子産物は TCA 回路に係わる酵素群であり、AarA はクエン酸シンターゼ、AarC はスクシニル CoA : アセテート CoA トランスフェラーゼ活性を示した¹²⁾。AarB の機能は未だ明確になっていない。酢酸菌は TCA 回路の構成酵素の一部を改変した TCA 回路を有している (Fig. 3)。*A. aceti* は通常の細菌に存在しているス

Fig. 2. *Gluconacetobacter* の細胞膜のリン脂質組成

高酸度生産菌である *Gluconacetobacter* の細胞膜のリン脂質には高い比率で THBH と PC が含まれている。高い比率でこれらの脂質が存在する微生物はあまり知られていない。

Fig. 3. 細胞内の酢酸の過酸化

細胞に浸透する酢酸は AarC と AarA によりアセチル CoA を経てクエン酸に変換される。さらに酢酸で誘導されるアコニターゼでクエン酸はイソクエン酸に変換される。この回路図は参考文献 13 より作成した。

クシニル CoA とコハク酸を相互変換するスクシニル CoA シンターゼを持っていないが、その代わりに AarC がそれを補っている。AarC は酢酸菌に特有の酵素であり、スクシニル CoA をコハク酸に変換し、その際に細胞内の酢酸へ CoA を転移する。酢酸はこの反応によりアセチル CoA に変換されるが、さらに AarA の反応によってクエン酸になる。このように、AarC と AarA とが作用することで、細胞内の酢酸は TCA 回路で消費される¹³⁾。また、酢酸菌のクエン酸シンターゼは大腸菌と比較すると、タンパク質表面が塩基性であり、細胞内の pH が下がった状態でも安定して機能していると考えられている。更に結晶構造解析により、このタンパク質が温度に対する高い安定性を持っていることも示されている¹⁴⁾。

A. aceti を用いて酢酸共存下で行ったプロテオーム解析の結果、アコニターゼが誘導されていることが確認された。アコニターゼも TCA 回路に関わる酵素である。*A. aceti* を用いてアコニターゼの高発現株を作製すると、親株との比較試験において、高発現株が親株よりも高い酢酸濃度の生産性を示すことが確認されている¹⁵⁾。

このように、酢酸菌は AarC を獲得することで細胞内に蓄積する酢酸を消費してエネルギーに変換する系と変えていった。そして TCA 回路の入口となる AarA をより強固なものに改変し、更に酢酸によってアコニターゼを誘導することにより、TCA 回路を通して細胞内の酢酸を効率よく消費する機構を備えたと考えられる (Fig. 3)。

2-3. 細胞内の酢酸を細胞外に排出する

酢酸菌において細胞内の酢酸を細胞外に排出する機構が2つ確認されている。一つは、ABC トランスポーターである。*A. aceti* の細胞膜タンパク質のプロテオーム解析において、微生物のマクロライド系抗生物質排出に関わるタンパク質と相同性を示すタンパク質が酢酸によって誘導されることが確認された。このタンパク質はATP結合カセット配列を有したABC トランスポーターと呼ばれるファミリータンパク質であった。*A. aceti* のABC トランスポーター遺伝子 (*aatA*) の破壊株は、親株に対して酢酸耐性が低下した。この破壊株はマクロライド系抗生物質に対する耐性や、低 pH 耐性、酢酸の資化能へは影響しなかった。また、この *aatA* 破壊株ではギ酸やプロピオン酸への耐性が低下したが、乳酸とクエン酸に対して有意差はなかった (Fig. 4)。酢酸と同様に、pKa が高い直鎖の脂肪酸に特有のトランスポーターであることが示唆された¹⁶⁾。さらに、*aatA* 高発現株を作製して酸度 11% まで発酵を行い、その細胞内の酢酸濃度を調べたところ、酸度 6%、8%、11% の何れのフェーズにおいても、高発現株は親株に比べ細胞内の酢酸濃度が低いことが確認できた。また、AatA を大腸菌に過剰発現させると大腸菌の酢酸耐性が向上することも確認された¹⁶⁾。従って、この AatA タンパク質が、トランスポーターとして細胞内酢酸を排出することにより酢酸菌の酢酸耐性に関与していることが明らかとなっている。

酢酸を細胞外に排出する機構の2つ目は、proton motive force に依存した排出系である。*A. aceti* の intact cell と membrane vesicle を用いて、放射性同位体でラベルした酢酸の細胞内の解析が行われた¹⁷⁾。Intact cell において、proton uncoupler や cyanide など細胞膜電位を打ち消すと、細胞内に蓄積する酢酸含量が増加した。このこ

とは何らかのエネルギー依存の排出ポンプがあることを示唆している。更に right-side-out membrane vesicle 内部の酢酸排出と inside-out membrane vesicle による酢酸の取り込みが、呼吸基質の添加で増加し、そして proton uncoupler で両者とも減速した。このことから、proton motive force に依存した efflux system であることが示唆された¹⁷⁾。

このように、酢酸菌には少なくとも2種類の酢酸排出システムが備わっていると考えられる。ひとつは、TCA サイクルによって細胞内の酢酸を消化して合成した ATP を利用して、ATP 結合型の ABC トランスポーターを活性化して細胞内の酢酸を排出する。またそれに加えて、エタノールの酸化で生じる膜電位を利用した proton motive force 依存の排出機構により、酢酸菌は細胞内に流入する酢酸を効率良く排出していると考えられる。

2-4. 細胞内の環境変化への対応

酢酸発酵において、酢酸菌に対してさまざまなストレスが発生する。基質となるアルコール、発酵に伴い発生する発酵熱、そして生成する酢酸などである。酢酸菌においては、これらのストレスに対して細胞内に複数のシャペロンが誘導されていることが確認されている。これらのシャペロンは何れもヒートショックで誘導される配列を有しており、転写開始因子 RpoH で制御されていると考えられている¹⁸⁾。*A. pasteurianus* において、*rpoH* 破壊株は親株よりも温度、エタノール、酢酸に対する感受性が高くなること、またその相補株は感受性が親株同等に戻ることが確認されている。また、GroES などの分子シャペロンを過剰発現させた *A. aceti* は、酢酸発酵において親株よりも高い濃度の酢酸の生産が可能となった。

Fig. 4. ABC トランスポーター破壊株と親株の比較

複数の有機酸を用いて、*A. aceti* 10-8S2 株 (親株) とその ABC トランスポーター破壊株 ($\Delta aatA$) への生育への影響比較を行った。(A) 酢酸、(B) 乳酸、クエン酸、ギ酸、及びプロピオン酸が複数濃度存在する YPG 培地を用いて 120 時間培養後の培養液の濁度を測定した。

1. 酢酸の浸入を防ぐ	<ul style="list-style-type: none"> • Squalene-hopene cyclase (<i>hpnF</i>) ⇒ 特徴のある細胞膜脂質 • pellicle polysaccharide formation
2. 酢酸を消費する	<ul style="list-style-type: none"> • <i>aarABC</i> (Citrate synthase, Succinyl-CoA:Acetate CoA-Transferase) • Aconitase ⇒ TCA サイクルの効率化
3. 酢酸を排出する	<ul style="list-style-type: none"> • ABC transporter • Proton motive force-dependent efflux system
4. 細胞内の安定化	<ul style="list-style-type: none"> • RpoH ・Stress protein (Molecular chaperones)

Fig. 5. 酢酸菌の酢酸耐性メカニズムのまとめ

前述の機構に加えて、シャペロンを誘導することにより、細胞内の酸性化などによるタンパク質の構造変化を抑制し細胞内の環境変化に対応する機構を有していると考えられる。

3. おわりに

本総説で述べた酢酸菌の酢酸耐性メカニズムの概要を Fig. 5 にまとめた。酢酸菌による食酢製造においては、さらに幾つものストレスが発生すると考えられる。例えば、エタノール酸化系の最終電子受容体である酸素へ、呼吸鎖末端酸化酵素が還元型のユビキノールから4電子を酸素分子に受け渡すが、このユビキノールから酸素分子への電子

伝達が、細胞内 pH が低下する過酷な条件下で正常に働かなければ、酸素が不完全に還元され活性酸素種が発生してしまう。また発酵にともなう発酵熱が発生する。最近の研究において、Superoxide anion や過酸化水素などの酸化ストレスから生体を防御する為の機構や発酵熱で誘導されるシャペロンなどが複数確認されている¹⁹⁾。これらの例も含めて、未だ解明されていない酢酸耐性メカニズムが存在するであろう。そして複数の酢酸耐性のメカニズムが相互に連携しながら機能することで、酢酸菌は高濃度の酢酸共存下でも生育を可能にしているのであろうと推測される。これら酢酸菌の持つ酢酸耐性の更なる解明は食酢製造技術の発展に貢献するものであり、今後の研究成果が期待される。

参考文献

- 1) 梶本修身, 大島芳文, 多山賢二, 平田洋, 塚本義則, 他 (2003) 食酢配合飲料の正常高値血圧者および軽症高血圧者に対する降圧効果. 健康・栄養食品研究 6 : 51-68.
- 2) Kondo T, Kishi M, Fushimi T, Ugajin S, Kaga T. (2009) Vinegar intake reduces body weight, body fat mass, and serum triglyceride levels in obese Japanese subjects. Biosci Biotechnol Biochem 73:1837-1843.
- 3) 伏見宗士, 大島芳文, 岸幹也, 西村明, 梶本修身, 他 (2005) 食酢飲料の血清総コレステロールに及ぼす影響および安全性の検討. 健康・栄養食品研究 8 : 13-26.
- 4) Fushimi T, Tayama K, Fukaya M, Tsukamoto Y, Sato Y, et al. (2002) The efficacy of acetic acid for glycogen repletion in rat skeletal muscle after exercise. Int J Sports Med 23:218-222.
- 5) 円谷悦造 (1998) 食中毒菌に対する食酢の抗菌作用. 食品工業 41 : 25-34.
- 6) Ishii S, Kishi M, Yamagami K, Abe K, Misaka T, et al. (2012) The use of mammalian cultured cells loaded with a fluorescent dye shows specific membrane penetration of undissociated acetic acid. Biosci Biotechnol Biochem 76:523-529.
- 7) 中野繁 (2006) 第 58 回生物工学会大会講演要旨集. 82.
- 8) Tahara Y, Yuhara H, Yamada Y. (1988) Distribution of tetrahydroxybacteriohopane in the membrane fractions of *Zymomonas mobilis*. Agric Biol Chem 52:607-609.
- 9) Hermans AF, Neuss B, Sahm H. (1991) Content and composition of hopanoids in *Zymomonas mobilis* under various growth conditions. J Bacteriol 173:5592-5595.
- 10) Matsushita K, Ebisuya H, Ameyama M, Adachi O. (1992) Change of the terminal oxidase from cytochrome *a*₁ in shaking cultures to cytochrome *o* in static cultures of *Acetobacter aceti*. J Bacteriol 174:122-129.
- 11) Kanchanarach W, Theeragool G, Inoue T, Yakushi T, Adachi O, et al. (2010) Acetic acid fermentation of *Acetobacter pasteurianus*: relationship between acetic acid resistance and pellicle polysaccharide formation. Biosci Biotechnol Biochem 74:1591-1597.
- 12) Fukaya M, Takemura H, Tayama K, Okumura H, Kawamura Y, et al. (1993) The *aarC* gene responsible for

- acetic acid assimilation confers acetic acid resistance on *Acetobacter aceti*. J Ferment Bioeng **76**:270–275.
- 13) 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.
 - 14) Francois JA, Starks CM, Sivanuntakorn S, Jiang H, Ransome AE, et al. (2006) Structure of a NADH-insensitive hexameric citrate synthase that resists acid inactivation. Biochemistry **45**:13487–13499.
 - 15) Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S. (2004) Enhanced expression of aconitase raises acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. FEMS Microbiol Lett **235**:315–322.
 - 16) Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S. (2006) Putative ABC transporter responsible for acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. Appl Environ Microbiol **72**:497–505.
 - 17) 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.
 - 18) Okamoto-Kainuma A, Ishikawa M, Nakamura H, Fukazawa S, Tanaka N, et al. (2011) Characterization of *rpoH* in *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283. J Biosci Bioeng **111**:429–432.
 - 19) Okamoto-Kainuma A, Ehata Y, Ikeda M, Osono T, Ishikawa M, et al. (2008) Hydrogen peroxide resistance of *Acetobacter pasteurianus* NBR3283 and its relationship to acetic acid fermentation. Biosci Biotechnol Biochem **72**:2526–2534.

Acetic acid tolerance in acetic acid bacteria

Hiroaki Ebisuya

Central Research Institute, Mizkan Holdings Co. Ltd.

Abstract

In the manufacturing process of fermented foods, such as bean paste, soy sauce, pickles, and alcohol, lactic acid bacteria produce lactic acid and play an important role in suppressing the growth of other microorganisms by lowering pH. Vinegar is one of the fermented foods and is well known for the high antimicrobial activity. The antimicrobial activity of acetic acid is partly due to lowering pH in environment as well as that of lactic acid. Since acetic acid is a hydrophobic small molecule which passes easily through the phospholipid bilayer of the bacterial membrane, it shows the higher antimicrobial activity compared with lactic acid.

Although acetic acid produced by acetic acid bacteria becomes stress for even the acetic acid bacteria themselves, they can be grown under highly concentrated acetic acid conditions. Several molecular machineries being responsible for acetic acid tolerance in acetic acid bacteria have been reported, including i) prevention of acetic acid influx into cell, ii) acetic acid assimilation, iii) acetic acid efflux by transporter or pump, and iv) protection of cytoplasmic proteins against denature by general stress proteins.

Since the acetic acid tolerance in acetic acid bacteria is conferred by several mechanisms, the mechanisms are introduced in this review.