食酢発酵液より分離した中酸度生成菌 NCI 1193 の同定およびエタノール酸化系酵素遺伝子の塩基配列

高桑直也 山根衣佳 後藤英嗣

小田有二* 深谷正裕** 塚本義則** 大西正男

(帯広畜産大学畜産科学科)

*独立行政法人農業技術研究機構

北海道農業研究センター畑作研究部

**株式会社ミツカングループ本社中央研究所)

平成 14 年 6 月 3 日受理

Identification of the Acetic Acid Bacterium NCI 1193 and Nucleotide Sequences of the Gene Encoding Enzymes Related to Ethanol Oxidation

Naoya TAKAKUWA, Kinuka YAMANE, Hidetsugu GOTO, Yuji ODA*, Masahiro FUKAYA**, Yoshinori TSUKAMOTO**, and Masao OHNISHI

(Department of Animal Sciences, Obihiro University of Agricultural and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan)

*Department of Upland Agriculture Research, National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Memuro, Hokkaido 082-0071

**Central Research Institute, Mitsukan Group Co., Handa, Aichi 475-8535)

The acetic acid bacterium NCI 1193, which produces a moderate concentration (12%) of acetic acid, was identified as *Acetobacter pasteurianus* from the physiological and biochemical characteristics and DNA analyses of the 16S rDNA and 16S-23S rDNA spacer regions. When the genes encoding alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and ubiquinol oxidase were amplified and sequenced, the putative amino acid sequences were homologous to those of the corresponding genes from other acetic acid bacteria. Subunits I and II of alcohol dehydrogenase showed a higher similarity to *A. aceti* than *A. pasteurianus*, suggesting that NCI 1193 was closely related to *A. aceti*.

Key words : 酢酸菌, 同定, *Acetobacter*——

緒言

酢酸菌とは、エタノールを酸化して酢酸を生成するグラム陰性の好気性細菌の総称で、*Acetobacter* 属や *Gluconobacter* 属などを含んでいる¹⁾。酢酸菌は、古くから食酢醸造に利用されており、大部分の酢酸菌によるエタノール酸化反応は、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) によって触媒され、それぞれデヒドロゲナーゼ本体 (サブユニット I)、シトクロム *c* (サブユニット II) および機能未知のタンパク (サブユニット III) から構成されている²⁾。エタノールの酸化反応によって生じた電子は、ユビキノンを經由して 4 つのサブユニットから成るユビキノールオキシダーゼ (UOX) に渡り、最終的に酸素に伝達される^{3,4)}。これらの酵素群はいずれも膜結合性であるため、その酵素活性は膜脂質の組成から大きな影響を受けると推察される。通常の食酢製造には約 20% の酢酸を生成する高酸度生産菌を使用するが、著者らは 12% 程度しか生成しない中酸度生成菌を食酢発酵液から分離した。そして酢酸生産能および酢酸耐性能における膜脂質の機能について調べるため、これらの菌におけるリン脂質とスフィンゴ脂質の化学組成の差異を検討し^{5,6)}、培養過程における脂質成分の変動を明らかにした⁷⁾。ところが、このとき中酸度生成菌として使用した菌株 *Acetobacter* sp. NCI 1193 の分類学的性質については不明な点が多く、一般的な酢酸菌と詳細に比較する必要があった。酢酸菌では種々の形質について自然変異が起こりやすく、エタノールのみならず酢酸、グルコン酸、ケトグルコン酸、グリセロールなどの酸化能の欠損や獲得現象がしばしば観察される。これらの形質の中で、とくにエタノール酸化能は酢酸菌の重要な分類学的指標となっている。本研究では、*Acetobacter* sp. NCI 1193 の生理・生化学的性質および DNA 解析によって菌種の同定を行うとともに、エタノール酸化に関与する三種の酵素遺伝子の塩基配列から一般的な酢酸菌との類縁性についても検討した。

実験方法

1. 供試菌株および培養

(株)ミツカングループ本社中央研究所において食酢発酵液から分離された酢酸菌 *Acetobacter* sp. NCI

Table 1 Oligonucleotides used as primers for PCRs

Primer	Sequence	Positions
16 S rDNA		
16 S-F	5'-GAGTTTGTATTCTGGCTCAGAGCGAACGCTG-3'	9 to 38 ^a
16 S-R	5'-AAAGGAGGTGATCCAGCCGAGGTTCCCT-3'	1542 to 1513 ^a
ITS region		
ITS-F	5'-AGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTT-3'	1513 to 1542 ^a
ITS-R	5'-CATCCACCGAATGCCCTTATCGCGCTCATT-3'	3527 to 3498 ^a
Subunit I and II of ADH complex		
ADH-I-F	5'-ATGACCCGCCCGCCTCCGCCAAGAGACGT-3'	Initiation codon to 30 of subunit I
ADH-II-R	5'-TTACTGGGCTTCATCCACACCAGCATGGGT-3'	Termination codon to 1391 of subunit II
Subunit III of ADH complex		
ADH-III-F	5'-ATGAAACTGATTGCCGTACGTGCCCTGTCG-3'	Initiation codon to 30
ADH-III-R	5'-TTACGAAACAGAACTGGTTTGACCATATTG-3'	Termination codon to 589
Internal sequence of ALDH subunit I		
ALDH-I-F	5'-CTBGGGBGGBBTTYGGBCG-3' ^b	1237 to 1259
ALDH-I-R	5'-GTVAGVAGYTCVAGVCG-3' ^b	1730 to 1714
TAIL-PCR primers		
ALDH-u 1	5'-GGATGGACGGTGAGCGGATGGAATCAAACA-3'	1387 to 1358
ALDH-u 2	5'-CCAGTTTAAACAGGCTTGCCACCCAGTGCCT-3'	1333 to 1304
ALDH-u 3	5'-ATCAGCGCGGCGGGAAGTGCCTAATCCCCG-3'	1298 to 1269
ALDH-d 1	5'-GCCACATTCCGTCCCGGTTGGCTGCGTTCG-3'	1598 to 1629
ALDH-d 2	5'-TCAGCTCCGTTGGACACCTTGGGCGCATG-3'	1631 to 1660
ALDH-d 3	5'-TGGCCCATGATTATGGGAAAGATCCGGTTG-3'	1679 to 1708
AD	5'-NGTCGASWGANAWGAA-3' ^b	(Arbitrary degenerate primer)
UOX complex		
UOX-II-F	5'-ATGAAAAACAAGTTACTGGCGAGAGTGGCG-3'	Initiation codon to 30 of subunit II
UOX-IV-R	5'-TTAGCGGGACATCATATGTTCCGGTGTGTGTT-3'	Termination codon to 301 of subunit IV

^aThe numbering of positions was based on the *Escherichia coli* numbering system (accession no. V 00348).

^bB=C, G, or T; Y=C or T; V=C, G, or A; N=A, C, G, or T; S=C or G; W=A or T.

1193 を、酢酸菌培養用 YPD 改変培地 (0.5% 酵母エキス, 0.3% ポリペプトンおよび 3% グルコース) で 30°C, 150 rpm で振盪培養した。

2. 生理学的試験および生化学的分析

酢酸と乳酸の酸化能, グリセロールからのケトン体生成能ならびにグルコースとマンノースをそれぞれ炭素源とした場合の酸とケトグルコン酸の生成能については既報に準じて分析した⁸⁾。また, ユビキノンのタイプは高速液体クロマトグラフィー分析で判定した⁹⁾。

3. PCR および塩基配列の決定

菌体から分離したゲノム DNA を鋳型として, Table 1 に示したプライマーによって PCR を行なった。TAIL (thermal asymmetric interlaced) -PCR は, Li と Whittier の方法¹⁰⁾ で行った。増幅された断片

の塩基配列は DNA シーケンサで決定し, 相同値を GENETYX computer program (Software Development Co., Ltd.) で算出した。分子系統樹は, CLUSTAL W program による近隣結合法¹¹⁾ で作成した。なお, 本研究で決定した塩基配列は, DDBJ に AB 086012~AB 086017 として登録されている。

実験結果

1. 分類学的性質

供試菌株のユビキノントypesはQ-9で, エタノールの酸化能があり, また酢酸に対する耐性を有したことから *Acetobacter* 属であり, さらに酢酸および乳酸の資化性を有し, D-グルコースからの 5-ケトグルコン酸生成能, D-マンノースからの酸生成能およびグリセロ

Fig. 1 Phylogenetic Relationships of NCI 1193 to the Strain Types of Genera *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* and *Gluconobacter* Based on the Complete Sequences of the 16 S rDNA gene and ITS. The accession numbers for the sequences used are given beside the species names. The phylogenetic distances were calculated according to Kimura's two-parameter equation, and the trees were constructed by the Neighbor-Joining method. The numerals indicate the percentages of bootstrap samplings, derived from 100 samples, supporting the internal branches.

ールからのケトン体生成能を欠損していることから、*A. pasteurianus* と推定した¹⁾。さらに、16 S rDNA の配列は *A. pasteurianus* LMD 22.1^T とは 99.4%，*A. aceti* NCIB 8621^T とは 97.0% の相同性であった。rDNA よりも塩基置換頻度が高く、近縁種の判別に効果的とされる ITS 領域¹²⁾ も、*A. pasteurianus* LMD 22.1^T とは 97.9%，*A. aceti* NCIB 8621^T とは 70.1% の相同性であった (Fig. 1)。これらの結果から、NCI 1193 を *A. pasteurianus* と同定した。

2. ADH 遺伝子

A. aceti K 6033 および *A. pasteurianus* NCI 1380 の ADH サブユニット I (BAA 14057, BAA 40252) および II (2009317 B, BAA 02993) をもとに設計したプライマー ADH-I-F および ADH-II-R で PCR を行くと、3700 bp の単一の増幅産物が得られ、5'-末端側に

おいては 2229 bp の ORF が見出された。推定アミノ酸配列は既報の酢酸菌由来の ADH サブユニット I といずれも高い相同性を示したが、*A. pasteurianus* 由来よりも *A. aceti* K 6033 由来のものに最も高い値 (98.4%) を示した (Table 2)。この PCR 増幅産物の 3'-末端側を調べてみると、1419 bp の ORF が存在していた。推定アミノ酸配列も *A. aceti* K 6033 のサブユニット II と相同性が高いことから (Table 2)、NCI 1193 は *A. pasteurianus* に分類されながらも、*A. aceti* ときわめて近縁であることが分かった。

A. pasteurianus NCI 1452 の ADH サブユニット III (BAA 02993) をもとに設計したプライマー ADH-III-F および ADH-III-R を用いた PCR では、618 bp の単一の増幅産物が得られた。推定アミノ酸配列は、*A. pasteurianus* NCI 1452 由来の ADH サブユニット

Table 2 Identity (%) of deduced amino acid sequences of ADH, ALDH and UOX subunits among NCI 1193 and other acetic acid bacteria

Organism	ADH subunit			ALDH subunit			UOX subunit			
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	IV
<i>A. aceti</i> K 6033	98.4 (BAA 14058)	99.6 (2009317 B)	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. aceti</i> No. 1023	—	—	—	—	—	—	97.3 (BAA 02481)	99.0 (BAA 02480)	98.0 (BAA 02482)	93.6 (BAA 02483)
<i>A. pasteurianus</i> NCI 1380	97.0 (BAA 40252)	96.6 (BAA 02993)	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. pasteurianus</i> NCI 1452	—	—	90.7 (BAA 06528)	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. polyoxogenes</i> NBI 1028	77.0 (BAA 00528)	72.5 (BAA 00529)	—	69.0 (BAA 00408)	—	—	—	—	—	—
<i>Acetobacter</i> sp.	—	—	—	68.9 (JU 0135)	—	—	—	—	—	—
<i>Ga. europaeus</i> DES 11 ^r	77.4 (CAA 70688)	72.5 (CAA 70689)	—	69.0 (CAA 69955)	58.2 (CAA 69953)	74.1 (CAA 69954)	—	—	—	—
<i>G. oxydans</i> IFO 12528	68.5 (BAA 19753)	60.2 (BAA 19754)	None (BAA 19756)	—	—	—	—	—	—	—

Accession numbers are shown in parentheses.

Acetobacter sp.	NCI1193	1	MKLI	↓	AVRAL	SALALT	TSLL	LAGAAV	SAHAQ	ENTDAP	VTRAGD	TSRLTD	VDPSG	FVGSID	PA	60			
A. pasteurianus	NCI1452	1	MKLI		AVRAL	SALALT	TSLL	LAGAAV	SAHAQ	ENTDAP	VTRAGD	TSRLTD	VDPSG	FVGSID	PA	60			

Acetobacter sp.	NCI1193	61	ENAG	LLNYC	VQNEY	VVDYD	DAGAR	CRNTT	KRPT	PCQK	GRKAI	CLTP	MVLP	VC	CMPT	TATPT	120		
A. pasteurianus	NCI1452	61	ENAG	LLNYC	VQNEY	VVDYD	DAGAR	CRNTT	KRPT	PCQK	GRKAI	CLTP	MVLL	LAC	CTPT	TTTPT	120		

Acetobacter sp.	NCI1193	121	LPWL	FCQC	VRKP	VR	LNCW	NGPRL	LCKQ	KAVI	PVLL	IRPD	HA	EHGM	MEGS	VTQSG	WPF	FCMN	180
A. pasteurianus	NCI1452	121	LPWL	FCQC	VRKP	VR	LNCW	NGPRL	LCKQ	KAVI	PVLL	IRPD	HA	EHGM	MEGS	VTQSG	WPF	FCMN	180

Acetobacter sp.	NCI1193	181	ALYL	VFMRC	RVFH	AGVQ	YQGT	SSVS											205
A. pasteurianus	NCI1452	181	AVYL	RCMP	DQGF	HAGV	QYGT	SSVS											205

Fig. 2 Comparison of Amino Acid Sequences of Subunit III of ADH Complex from NCI 1193 and *A. pasteurianus* NCI 1452. The white type on the black background indicates cystein residues, which possibly serve as disulfide bonds with cystein residues of ADH subunit I. The vertical arrow indicates the signal peptide cleavage site. Asterisks indicate identical amino acids.

III と 90.7% の相同性が認められたが、ADH サブユニット I との S-S 結合に関与していると考えられるシステイン残基が 1 つ多かった (Fig. 2)。また、*Gluconacetobacter oxydans* IFO 12528 の ADH サブユニット III とは相同性が認められなかった。

3. ALDH 遺伝子

A. polyoxogenes NBI 1028 (BAA 00408), *Acetobacter* sp. (JU 0135), *Gluconacetobacter europaeus* DES 11^T (CAA 69955) および好熱菌 *Aquifex aeolicus* VF 5 (AAC 06554) のアミノ酸配列間に共通して保存されている領域 LGGGFGR および RLELL (T/E) をもとに設計したプライマー ALDH-I-F および ALDH-I-R を用いた PCR により 491 bp の増幅産物が得られ、その塩基配列は既報の酢酸菌の ALDH サブユニット I の内部配列と高い相同性を示した。そこで、この増幅産物の配列をもとに 3 段階の TAIL-PCR によって約 3 kb の隣接領域を取得した。この塩基配列から、*Gluconacetobacter europaeus* の ALDH と同様にサブユニット II, III および I の順で遺伝子クラスターを形成していることがわかった。サブユニット II, III および I の推定 ORF の塩基鎖長は、それぞれ 1329 bp, 477 bp および 2328 bp であり、既報の酢酸菌に由来するサブユニットの推定アミノ酸配列と高い相同性を示した (Table 2)。

4. UOX 遺伝子のクローニング

A. aceti No. 1023 の UOX クラスター (BAA 02480

-BAA 02483) をもとにして設計したプライマー UOX-II-F および UOX-IV-R を用いた PCR では、3860 bp の単一の増幅産物が得られ、5'-末端側から、927 bp, 1992 bp, 606 bp および 330 bp の推定 ORF が見出され、*A. aceti* と同様に II, I, III および IV の順でクラスターを形成していた。推定アミノ酸配列は、*A. aceti* No. 1023 の UOX 複合体のサブユニット I から IV ままでいづれも高い相同性を示した (Table 2)。

以上のように *Acetobacter* sp. NCI 1193 は、16 S rDNA および ITS の塩基配列から *A. pasteurianus* に分類されるものの、エタノール酸化系酵素のアミノ酸配列に関しては酢酸製造によく使用される *A. aceti* に類似していた。このような差異については他の酢酸菌についてもさらに調べる必要があるが、進化過程における様々な環境要因によって、エタノール酸化系酵素遺伝子の塩基置換頻度が 16 S rDNA 配列および ITS 領域のそれらとは異なるためと考えられる。

要 約

酢酸発酵液から分離した中酸度生成菌 NCI 1193 の、生理・生化学的性質および 16 S rDNA と 16 S-23 S rDNA スペーサー (ITS) 領域の塩基配列から、*Acetobacter pasteurianus* と同定した。また、この菌株からエタノール酸化に関与するアルコールデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼおよびユビキノールオキシダーゼの各遺伝子を増幅し、その塩基配列

を決定したところ、他の酢酸菌由来の遺伝子と高い相同性を示した。アルコールデヒドロゲナーゼのサブユニット I と II の推定アミノ酸配列は、それぞれ既報の *A. pasteurianus* よりも *A. aceti* のそれらと相同性が高いことから、NCI 1193 は *A. pasteurianus* に分類されながらも、*A. aceti* ときわめて近縁であることが分かった。

文 献

- 1) J. De Ley, M. Gillis, J. Swings: In *Bergey' Manual of Systematic Bacteriology*, (Eds N. R. Krieg and J. G. Holt), Vol. 1, pp. 267-274. Baltimore, Williams & Willkins Co., Baltimore (1984)
- 2) M. Ameyama, O. Adachi: *Methods Enzymol.*, **89**, 450-457, 491-497 (1982)
- 3) M. Fukaya, K. Tayama, T. Tamaki, H. Ebisuya, H. Okumura, Y. Kawamura, S. Horinouchi, T. Beppu: *J. Bacteriol.*, **175**, 4307-4314 (1993)
- 4) K. Matsushita, E. Shinagawa, O. Adachi, M. Ameyama: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9863-9867 (1990)
- 5) 後藤英嗣, 益子まゆみ, 大西正男, 塚本義則: 日本油化学会誌, **49**, 349-355 (2000)
- 6) 後藤英嗣, 大西正男, 伊藤精亮, 塚本義則: 脂質生化学研究, **40**, 164-167 (1998)
- 7) 後藤英嗣, 山内奈緒, 大西正男, 伊藤精亮, 塚本義則: 日本農芸化学会 1999 年度大会講演要旨集, p. 14 (1997)
- 8) J. G. Carr: In *Identification Methods for Microbiologists*. (Eds B. M. Gibbs and D. A. Shapton), Technical Series No. 2, Part B, pp. 1-8. Academic Press, London (1968)
- 9) Y. Yamada, K. Aida, T. Uemura: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **15**, 186-196 (1969)
- 10) Y. G. Liu and R. F. Whittier: *Genomics*, **25**, 674-681 (1995)
- 11) N. Saitou, M. Nei: *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425 (1987)
- 12) 小田有二, 福長将仁: 化学と生物, **36**, 7-8 (1998)