

307 高酢酸耐性酢酸菌のエタノール酸化酵素遺伝子の解析と遺伝子組み換え手法を用いた育種 (中塾酢店中研) ○深谷正裕、多山賢二、玉置敏視、奥村 一、川村吉也 (東大農化) 堀之内末治、別府輝彦

目的) 食酢醸造に特徴的な生産工程である“酢酸発酵”は、エタノールが酢酸に酸化されるプロセスで、強いエタノール酸化能と酢酸耐性能で特徴づけられる酢酸菌 (*Acetobacter* 属・*Gluconobacter* 属) を利用している。酢酸菌固有のこれら2つの形質はいずれも分類学的に重要な指標であり、しかも酢酸発酵を行わせる上で不可欠な形質であるが、その生化学的・遺伝学的研究例は乏しく、特に工業的に使用されている菌株については皆無に近かった。近年、優れた酢酸菌宿主ベクター系が開発され、遺伝子組み換え技術を用いた分子遺伝学的な解析や育種が可能になりつつある。本研究は、20%以上の酢酸に耐性を示す高酢酸耐性菌 *A. polyoxogenes* から、エタノール酸化の要である細胞膜結合型アルコール脱水素酵素 (ADH) ・アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) の精製を試み、また、遺伝子組み換え手法を用いて分子遺伝学的に解析し、実用菌のエタノール酸化機構解明を目的とした。さらにクローン化した遺伝子を利用した酢酸発酵菌の新しい育種方法の開発も目的とした。

方法及び結果) (1) *A. polyoxogenes* のADHおよびALDHの精製とその性質

界面活性剤で細胞膜画分から可溶化し、イオン交換クロマト、ヒドロキシアパタイトクロマトによって単一に精製した。ADH、ALDHの分子量はゲル濾過でそれぞれ320kDa、90kDaで、SDS-PAGEでそれぞれ72kDaと44kDa、75kDaと19kDaの2つのサブ・ユニットに分かれた。ADHの44kDaのサブ・ユニットは吸収スペクトルからチトクロームcと決定され、72kDaのサブ・ユニットがADH活性を担う本体と推定された。ADH、ALDHともPQQを有するキノ・プロテインであった。本菌のADHはエタノールを良好な基質としたが、他の酢酸菌のADHが作用しないアセトアルデヒドに対する酸化活性も示した。ALDHは、直鎖アルデヒドを特異的に酸化し、従来報告されているADHと同様の基質特異性を示したが、最適pHが中性付近にある点などに特徴があった。

(2) *A. polyoxogenes* のADH遺伝子・ALDH遺伝子のクローニング

精製したADH・ALDH蛋白の部分アミノ酸配列をもとにして作製した合成DNAまたは特異的な抗体を用いて、脱水素酵素活性を担うと推定された大分子量のサブユニットの構造遺伝子のクローニングを試みた。塩基配列・ウエスタン解析及び酢酸菌での酵素活性の発現から、ADH遺伝子は約7.0kbのPstI断片上に、ALDH遺伝子は約3.4kbのAvaI断片に全長がコードされていることを確認した。塩基配列の結果から、ADHの72kDaの構造遺伝子のすぐ下流にADHの44kDaのサブユニットの構造遺伝子が存在していることが明らかになった。ADH活性やALDH活性を欠失した酢酸菌変異株にクローン化遺伝子を導入した解析結果から、ADH活性の発現には2つのサブユニット (72kDaと44kDa) の存在が必須であると推定された。一方、ALDHでは、大分子量のサブユニット (75kDa) だけで活性の発現が見られた。

(3) ALDH遺伝子を用いた酢酸発酵菌の改良

中程度の発酵能を持つ *A. aceti* subsp. *xylinum* NBI2099 (食酢もろみ分離菌) を宿主として用い、(2) でクローン化したALDH遺伝子を酢酸菌ベクターに連結し導入した。得られた形質転換株は、ALDH蛋白を過剰生産しており、ALDHの比活性も増大 (2倍) していた。形質転換株の酢酸発酵能を検討したところ、酢酸の生産速度と最終到達酢酸濃度がそれぞれ親株の2倍、1.4倍向上していた。

以上、従来知見の乏しかった実用菌のエタノール酸化機構の生化学的・遺伝学的背景の一部を明らかにすることができたのみならず、遺伝子組み換え技術を利用した酢酸発酵菌の新しい改良法の可能性についても示すことができた。

参考文献) 1) Okumura et al., *Agric. Biol. Chem.* 49, 1011 (1985) 2) Fukaya et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 176, 181 (1989) 3) Fukaya et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 171 (1989) 4) Fukaya et al., *J. Bacteriol.*, 172, 2096 (1990)

"Genetic Analysis and Improvement of Ethanol Oxidizing Ability of Highly Acetic Acid Tolerant *Acetobacter*" M. Fukaya, K. Tayama, T. Tamaki, H. Okumura, Y.

Kawamura (Nakano Vinegar Co., Ltd.), S. Horinouchi and T. Beppu (Univ. of Tokyo)