

(別紙様式第3号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: Kaewta Sootsuwan

題目: *Zymomonas mobilis*の呼吸鎖と耐熱性株の特性に関する研究

(Study on the respiratory chain of ethanologenic *Zymomonas mobilis* and characteristics of its thermotolerant strains)

*Zymomonas mobilis*は *Saccharomyces cerevisiae* に代わることのできるエタノール生産菌である。本菌は、そのほとんどの ATP (グルコース 1 モル当たり約 1 モルの ATP) を Entner-Doudoroff (ED)-glyceraldehyde-3-phosphate-to-pyruvate (G P) 経路で獲得し、その低い ATP 生産性を補うためにそれらの代謝経路のグルコースフラックスを高いレベルに保っている。そのために関連した酵素を大量に発現し、その量は可溶性タンパクの 30-50%にも達する。一方、本菌が不完全な TCA 回路をもつことを考慮すると、グルコース当たりの NADH および ATP の生産量は低いと推測され、呼吸鎖によって NADH が酸化されることはエタノール生産にとって不都合である。このことから、呼吸鎖は NADH をエタノール生産経路と奪い合っている可能性がある。

1 章では *Z. mobilis* の呼吸鎖を解析した。好気培養および嫌気培養した菌から膜画分を調製し、NADH, D-乳酸, D-グルコースを基質とする脱水素酵素活性とオキシダーゼ活性およびユビキノールを基質とするオキシダーゼ活性を測定し、比較した。予想に反して、NADH オキシダーゼ活性が完全な TCA 回路をもつ大腸菌や *Pseudomonas putida* のものより強いことが示され、NADH オキシダーゼ活性が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、*Z. mobilis* 膜画分において、シアン耐性末端オキシダーゼ活性が検出された。これはゲノム解析の結果から末端オキシダーゼとして唯一存在する *bd*型ユビキノールオキシダーゼによるものと推測された。末端オキシダーゼは比較的強いユビキノール

ルオキシダーゼ活性を示したが、非常に弱いチトクロム *d* の吸収スペクトルを示した。これらの実験事実および I 型ではなく II 型の NADH 脱水素酵素のみをもつことから、*Z. mobilis* は膜エネルギー生産性の低い単純な呼吸鎖を獲得したと考えられる。

第 2 章では、耐熱性 *Z. mobilis* を見出すために、タイの 4 つの分離株を用いて異なる温度における生育やエタノール生産性をエタノール高生産株 ZM4 (NRRL B-14023) と比較した。TISTR405、TISTR548、TISTR550 は 39 度で良好に生育したが、TISTR405 のみが 30 度と同じレベルのエタノール生産性を示し、39 度でのエタノール生産性は ZM4 の 30 度のレベルよりも高いことが示された。これらのことから TISTR405 は高温エタノール発酵に適していることが判明した。エタノール合成および分解に関わる遺伝子（アルコール脱水素酵素 AdhA と AdhB の遺伝子 *adhA* と *adhB* およびピルビン酸脱炭酸酵素の遺伝子 *pdh*）を解析したところ、これらの遺伝子は TISTR405 と ZM4 間で極めて高く保存されていることが分かった。異なる温度や増殖ステージにおける両株のそれら遺伝子の発現や遺伝子産物の酵素活性を比較したところ、転写レベルには大きな差は見られなかったが、TISTR405 の AdhA と AdhB との活性の総和が ZM4 のものより顕著に高いことが示された。さらに、両株ともに AdhB 活性が増殖定常期に高くなることが分かった。