

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	KAEWTA SOOTSUWAN
審査委員	主査 山田 守 (印) 副査 松下 一信 (印) 副査 川向 誠 (印) 副査 森 信寛 (印) 副査 阿座上弘行 (印)
題目	Study on the respiratory chain of ethanologenic <i>Zymomonas mobilis</i> and characteristics of its thermotolerant strains
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p><i>Zymomonas mobilis</i>は <i>Saccharomyces cerevisiae</i> に代わるエタノール生産菌として期待されている。特に、<i>S. cerevisiae</i> に比べて菌体当たりのエタノール生産性が高く、その点で有用性が高いと言われている。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-puruvate (GP) 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。本研究では、<i>Z. mobilis</i> の呼吸鎖の詳細な解析を行うと同時に、より安価で効率的な高温エタノール発酵のための耐熱性 <i>Z. mobilis</i> の探索を行っている。</p> <p>まず、<i>Z. mobilis</i> の呼吸鎖解析について以下のような結果を得ている。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 <i>Pseudomonas putida</i> 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を示した。また、<i>Z. mobilis</i> 膜画分において、シアン耐性末端オキシダーゼ活性を見出した。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 <i>bd</i>-型ユビキノールオキシダーゼ</p>	

によるものと推測している。末端オキダーゼは比較的強いユビキノー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予想している。

次に、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) と比較している。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を示した。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を明らかにした。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、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を示した。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、転写レベルに違いがないこと、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を示した。さらに、両株ともに AdhB 活性が増殖定常期に高くなることを示した。

以上のように本研究は、従来にない経済的な高温エタノール発酵のための基礎研究と応用のための耐熱性菌の獲得を行ったものであり、学問的にも重要な情報を提供している。よって学位論文として十分に相応しいと評価した。