

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Ittipon Saichana
審査委員	主査 松下一信 (印) 副査 森信寛 (印) 副査 澤嘉弘 (印) 副査 右田たい子 (印) 副査 阿座上弘行 (印)
題目	Studies on 5-keto-D-gluconic acid (5KGA) production at higher temperature by <i>Gluconobacter</i> strains: screening of thermotolerant strains and development of high 5KGA-producing strains (グルコノバクター属酢酸菌による高温 5-ケトグルコン酸 (5KGA) 生産系に関する研究: 耐熱性酢酸菌のスクリーニングと高温 5KGA 生産菌の開発)
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>グルコノバクター属酢酸菌は広範囲の糖や糖アルコールを酸化し、大量の酸化生成物を培地中に蓄積することができる。このグルコノバクター属酢酸菌によるケトグルコン酸の生産には2つの膜結合型酵素が関与していることが明らかになっている。1つが、2-ケトグルコン酸 (2KGA) 生成酵素である FAD グルコン酸脱水素酵素 (FAD-GADH) であり、もう1つが、PQQ グリセロール脱水素酵素 (PQQ-GLDH) である。後者は、グルコン酸から 5-ケトグルコン酸 (5KGA) をも生成することができる非常に広い基質特異性をもつ酵素である。本研究では、産業的に有用な 5KGA を選択的に、しかも冷却コストがかからず温度管理の容易な生産システムの構築を目指して、高温 5KGA 生産菌の開発をすすめられている。</p> <p>本研究では、まず 2KGA および 5KGA を簡便で正確に測定する必要性から、グルコノバクター属酢酸菌の細胞質に存在する 2KGA 還元酵素 (2KGR) および 5KGA 還元酵素 (5KGR) をコードする 5KGR 遺伝子と 2KGR 遺伝子が同定し、大腸菌での大量発現系が確立され、精製酵素を用いた 2KGA および 5KGA の簡易測定法が確立された。</p> <p>続いて、タイで分離されたグルコノバクター属酢酸菌の中から、37°C で 5KGA を生産できる耐熱性酢酸菌のスクリーニングが行われ、2KGA が主生産物ではあるが、その半分程度の 5KGA を 37°でも生産できる菌株として、<i>Gluconobacter frateurii</i> THE42, THF55, THG42 の3株が選択された。さらに、高温 5KGA 生産株を開発する目的で、それらの耐熱性株の 2KGA 生産に関与する FAD-GADH 遺伝子がインバース PCR 法でクローン化され、<i>gndFGH</i> オペロンとして特定された。</p>	

続いて、その *gndG* 遺伝子の破壊株が作成され、その菌が 30°C で 5KGA だけを大量に生産することが確認された。しかし、その生産能は 37°C で半減することが示されたため、培養条件の検討が行なわれた。結果、5KGA 生産酵素 PQQ-GLDH の PQQ の保持に有効なカルシウムを培地中に添加することで生産性が高められることが示され、高温 (37°C) での 5KGA 生産系の開発に成功している。

しかし、その後の継代培養によって、2KGA の生産が徐々に回復することが明らかとなった。*gndG* 遺伝子破壊は保持されており、別の酵素遺伝子の発現がこの現象に関与していると予測された。そこで、以前に別の GADH 遺伝子 (*gndSLC*) が分離され、かつその遺伝子破壊では 2KGA 生産能が失われないことが明らかとなっていた 2KGA 主生産菌である *G. frateurii* NBRC3271 株を用いて、第 2 の GADH 遺伝子の検索を行なわれた。結果、*gndSLC* とは別に *gndFGH* ホモログが検出された。これら 2 種類の GADH 遺伝子それぞれの破壊株、および両遺伝子破壊株の作成がなされ、*gndG* 欠損株は 2KGA 生産能に大きな影響を及ぼさないが、*gndL* 欠損株は大幅に 2KGA 生産の低下を引き起こし、両酵素欠損はその生産を完全に失わせることが示された。このようにして、グルコノバクター属酢酸菌には、2KGA 高生産に係る *gndSLC* 遺伝子由来の GADH-1 と酢酸菌に普遍的に存在する *gndFGH* 遺伝子由来の GADH-2 とが共存することが明らかにされた。

このように、本研究では、耐熱性グルコノバクター属酢酸菌のスクリーニングと遺伝子破壊を通じて高温 5KGA 発酵系の開発に成功するとともに、共存する 2 つの GADH の遺伝子解析を通じた生理学的研究も行われている。それ故、本研究は、酢酸菌・酸化発酵の応用研究としても、またその基礎研究としても高く評価される成果をあげていると判断された。